

Philipps



Universität  
Marburg

**Genetik und Biochemie des Katabolismus von 5-Hydroxyectoin und  
Ectoin in dem marinen Bakterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Annina Schulz**  
aus Löbau

Marburg/Lahn 2016



Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2012 bis Juni 2016 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als  
Dissertation angenommen am: 19.07.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Anke Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2016

*Mir drehte sich im Kopf mein Karussell [...]*

Herta Müller

In Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation wurden folgendes Manuskripte eingereicht:

**Schulz A.**, Stöveken N., Binzen I. M., Hoffman T., Heider J., and Bremer E. (2016) Feeding on compatible solutes: Ectoine degradation in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. Environ. Microbiol. *in press*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Das marine Ökosystem .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Das marine Bakterium <i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3.....</b>	<b>3</b>
<b>3.3 Mikrobielle Anpassung an erhöhte Osmolaritäten.....</b>	<b>4</b>
3.3.1 Kompatible Solute .....	5
3.3.1.1 Die kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin.....	6
3.3.1.2 Der Biosyntheseweg von Ectoin und 5-Hydroxyectoin .....	7
3.3.2 Kompatible Solute als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle.....	7
3.3.2.1 Der Katabolismus von Glycinbetain .....	8
3.3.2.2 Der Katabolismus von Ectoinen .....	9
3.3.2.2.1 Das katabole 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Gencluster aus <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 .....	10
3.3.2.2.2 Der vorgeschlagene Reaktionsweg des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaus zu L-Aspartat .....	11
<b>3.4 Aktiver Stofftransport über die bakterielle Zellmembran.....</b>	<b>13</b>
3.4.1 Die ATP-abhängige Translokation von Stoffen durch ABC-Transporter .....	14
3.4.1.1 Transportmechanismus der ABC-Transporter.....	14
3.4.1.2 Ectoin-Transport in <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	15
3.4.2 Die Translokation von Stoffen durch TRAP-Transporter erfolgt in Abhängigkeit der protonenmotorische Kraft.....	16
3.4.2.1 Putativer Transportmechanismus .....	16
3.4.2.2 Ectoin-Transport in <i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3 und <i>Halomonas elongata</i> .....	17
<b>3.5 Bakterielle Anpassung an veränderliche Umwelteinflüsse .....</b>	<b>18</b>
3.5.1 Einkomponentensysteme .....	20
3.5.1.1 Die helix-turn-helix Gruppe der GntR-Transkriptionsregulatoren .....	20
3.5.1.2 Die MocR-Subfamilie der GntR-Typ Transkriptionsregulatoren.....	21

3.5.1.3 Die Lrp/AsnC-Familie.....	23
3.5.2 Zweikomponentensysteme.....	24
3.5.2.1 Stickstoffkontrolle durch die Ntr-Zweikomponentensysteme .....	24
<b>3.6 Zielsetzung.....</b>	<b>26</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Osmoprotektion in <i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3 .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 'Northern Dot Blot'-Analysen zur Transkription verschiedener Gene des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Operons .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Der Einfluss verschiedener chromosomaler Deletionen auf das Wachstum von <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 mit Ectoinen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4 Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle des katabolen <i>enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf</i>-Operons .....</b>	<b>36</b>
4.4.1 <i>enuR</i> und <i>uehA</i> werden von verschiedenen Promotoren exprimiert .....	36
4.4.2 Die Abhängigkeit der Expression von P <sub><i>uehA</i></sub> von weiteren Faktoren .....	38
4.4.3 EnuR wirkt als Repressor und Aktivator auf P <sub><i>uehA</i></sub> .....	41
<b>4.5 Biochemische Charakterisierung des EnuR-Transkriptionsfaktors .....</b>	<b>43</b>
4.5.1 <i>In silico</i> Analyse der tertiären Struktur von EnuR.....	43
4.5.2 EnuR bindet Pyridoxal-5'-Phosphat.....	44
4.5.3 Identifizierung des PLP-Cofaktors .....	45
4.5.3.1 Identifizierung des Cofaktors mittels UV/Vis-Spektroskopie .....	45
4.5.3.2 Identifizierung des Cofaktors mittels Massenspektrometrie.....	46
4.5.4 Die sekundär Struktur von EnuR und EnuR* .....	49
4.5.5 Die quaternäre Struktur von EnuR und EnuR* .....	50
4.5.6 Analysen zur Ligandenbindung durch EnuR.....	51
4.5.7 Protein-DNA-Interaktionsstudien .....	53
<b>4.6 Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle des <i>uehA</i>-Promotors.....</b>	<b>56</b>
4.6.1 Charakterisierung der Funktion von EnuR.....	56
4.6.1.1 Die PLP-Abhängigkeit von EnuR <i>in vivo</i> .....	56
4.6.1.2 EnuR-Induktor-Interaktionen <i>in vivo</i> .....	58
4.6.1.2.1 Die Induktion der Transkription ausgehend von P <sub><i>uehA</i></sub> ist EutD-abhängig 58	
4.6.1.2.2 Die Induktion der Transkription ausgehend von P <sub><i>uehA</i></sub> ist EutABC-abhängig .....	59
4.6.2 Der Einfluss weiterer Transkriptionsaktivatoren auf P <sub><i>uehA</i></sub> .....	61
4.6.2.1 Der Transkriptionsregulator AsnC.....	61



4.6.2.2 Das Zweikomponentensystem NtrXY .....	62
<b>4.7 bioinformatische Untersuchungen.....</b>	<b>63</b>
4.7.1 Die phylogenetische Verbreitung der katabolen Gene des 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-Abbaus .....	63
4.7.2 genomischer Kontext des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucusters .....	65
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 physiologische Untersuchungen .....</b>	<b>71</b>
5.1.1 Der Einfluss verschiedener kompatibler Solute auf das Wachstum von <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 bei erhöhter Osmolarität .....	71
5.1.2 Die substratinduzierte Aufnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin.....	72
<b>5.2 Der 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus .....</b>	<b>74</b>
5.2.1 Die Funktion der Genprodukte des <i>enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf</i> -Operons aus <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.....	74
5.2.1.1 Das <i>eutABC</i> -Gencluster .....	74
5.2.1.2 Die Ectoin-Hydrolase EutD .....	75
5.2.1.3 Die enzymatische Umwandlung von 2,4-Diaminobutyrat zu L-Aspartat durch Atf und Ssd.....	76
5.2.1.4 Die Aufnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin in das Cytoplasma .....	77
5.2.1.5 Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Synthese in Organismen die Ectoine katabolisieren .....	78
5.2.2 Die phylogenetische Verteilung und die genetische Anordnung der Gene des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus.....	78
5.2.3 Genomische Duplikationen der katabolen Gencluster .....	79
<b>5.3 Analysen zur transkriptionellen Regulation des <i>enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf</i>-Operons von <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.....</b>	<b>81</b>
5.3.1 Nur der Promotor vor <i>uehA</i> ist substratinduzierbar .....	81
5.3.2 Der Einfluss von EnuR auf $P_{uehA}$ .....	82
5.3.3 Das Regulatorprotein EnuR.....	84
5.3.4 Analysen zum internen Induktor des EnuR-Transkriptionsfaktors.....	86
5.3.5 Der Transkriptionsfaktor AsnC .....	92
5.3.6 Das NtrXY-Zweikomponentensystem.....	93
<b>5.4 Modell der transkriptionellen Kontrolle des Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus in <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.....</b>	<b>95</b>
<b>5.5 Ausblick .....</b>	<b>98</b>

<b>6. Material und Methoden .....</b>	<b>100</b>
<b>6.1. Material.....</b>	<b>100</b>
6.1.1 Geräte.....	100
6.1.2 Chemikalien .....	101
6.1.3 Kits.....	103
6.1.4 Antibiotika .....	103
6.1.5 Enzyme und Standards .....	103
6.1.6 Datenbanken und Tools .....	103
6.1.7 Allgemeine Puffer.....	104
<b>6.2 Methoden .....</b>	<b>104</b>
6.2.1 Stammhaltung.....	104
6.2.2 Medien und Wachstumsbedingungen .....	104
6.2.3 Bestimmung der Zelldichte .....	107
6.2.4. Herstellung chemisch kompetenter Zellen (372).....	107
6.2.5 Transformation chemisch-kompetenter Zellen.....	107
6.2.6 Triparental Mating .....	108
6.2.7 Mechanischer Zellaufschluss .....	108
6.2.7.1 Zellaufschluss in einem diskontinuierlichem Hochdruck-Homogenisator.....	108
(French Press).....	108
6.2.7.2 Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators .....	109
6.2.8 Arbeiten mit DNA .....	109
6.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	109
6.2.8.2 Agarosegelelektrophorese .....	110
6.2.8.3 Isolation von DNA aus DNA-Agarosegelen.....	110
6.2.8.4 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	110
6.2.8.5 Konstruktion von Plasmiden .....	111
6.2.8.6 Isolation von Plasmid-DNA .....	113
6.2.8.7 Isolation chromosomaler DNA aus <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 (379) .....	113
6.2.8.8 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA .....	113
6.2.9 Arbeiten mit Proteinen.....	114
6.2.9.1 Überproduktion von Proteinen .....	114
6.2.9.2 Strep-Tag II Affinitäts-Chromatographie.....	114
6.2.9.3 Einengen der Proteinlösung.....	115
6.2.9.4 Größenausschlusschromatographie .....	115
6.2.9.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	115
6.2.9.6 1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE).....	116

6.2.9.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	117
6.2.9.8 Microscale thermophoresis (MST) .....	117
6.2.9.9 Circular-Dichroism Spektroskopie .....	118
6.2.9.10 UV/Vis-Spektroskopie .....	118
6.2.9.11 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	118
6.2.10 Arbeiten mit RNA .....	120
6.2.10.1 Isolation von der gesamten RNA aus <i>R. pomeroi</i> DSS-3 .....	120
6.2.10.2 Transkriptions-Analysen durch Northern Dot Blot .....	120
6.2.11 Bioinformatische Analysen .....	121
<b>6.3. Oligonukleotide .....</b>	<b>123</b>
<b>6.4 Plasmide.....</b>	<b>129</b>
<b>6.5. Bakterienstämme.....</b>	<b>131</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>157</b>
<b>9. Erklärung .....</b>	<b>170</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

---

<b>A230</b>	Absorption bei 230 nm
<b>A260</b>	Absorption bei 260 nm
<b>A280</b>	Absorption bei 280 nm
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>bp</b>	Basenpaare (base pairs)
<b>C-terminal</b>	carboxyterminal
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b><i>et al.</i></b>	und andere
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>OD<sub>578</sub></b>	optische Dichte bei 578 nm
<b>OPA</b>	o-Phthaldialdehyd
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-HCl/Acetat/EDTA
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-Diol
<b>UV/Vis</b>	Ultraviolett/sichtbares Licht (visible)
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen (volume per volume)
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galactosid
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Synthese.....	7
Abbildung 2: Das katabole Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gencluster aus <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.....	10
Abbildung 3: Putativer Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus in <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 .....	13
Abbildung 4: Translokationsmechanismus eines Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporters.....	15
Abbildung 5: Putativer Translokationsmechanismus eines TRAP-Transporters.....	17
Abbildung 6: Einkomponentensysteme (a) und Zweikomponentensysteme (b) .....	19
Abbildung 7: GabR aus <i>B. subtilis</i> .....	22
Abbildung 8: Zweikomponentensysteme der generelle Stickstoffkontrolle .....	25
Abbildung 9: Das Wachstum vom <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen .....	28
Abbildung 10: Osmoprotektion von <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 durch verschiedene kompatible Solute .....	29
Abbildung 11: Transkriptionelle Kontrolle des <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 <i>enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf</i> -Operons .....	30
Abbildung 12: Wachstumskurven des Rif <sup>R</sup> Wildtypstamms <i>R. pomeroyi</i> J470 und diverser Mutantenstämmen .....	32
Abbildung 13: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf das Wachstum von <i>R. pomeroyi</i> ASR9 .....	35
Abbildung 14: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der <i>lacZ</i> -Fusionen für die Reporteranalysen .....	37
Abbildung 15: Expressionsmuster der drei Reporterfusionen in <i>R. pomeroyi</i> J470.....	38
Abbildung 16: Der Einfluss von hohen Salinitäten auf $P_{uehA}$ in <i>R. pomeroyi</i> J470.....	39
Abbildung 17: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR6 [ $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] .....	40
Abbildung 18: Expressionsmuster verschiedener Reporterfusionen in <i>R. pomeroyi</i> J470 und <i>R. pomeroyi</i> ASR7 [ $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$ ] .....	42
Abbildung 19: <i>in silico</i> Modell von EnuR.....	44
Abbildung 20: Rekombinante Überproduktion von EnuR und der Lys-302/His-Mutante (EnuR*) .....	45
Abbildung 21: UV/Vis-Spektren von EnuR und der Lys-302/His Mutante (EnuR*).....	46
Abbildung 22: MS-Spektren von EnuR und EnuR* .....	48
Abbildung 23: Die sekundäre Struktur von EnuR und der Lys-302/His Mutante (EnuR*).....	50
Abbildung 24: Die quaternäre Struktur des EnuR-Strep-tag II-Proteins und der Lys302/His Mutante (EnuR*-Strep-tag II) .....	51
Abbildung 25: EnuR bindet N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat <i>in vitro</i> .....	53
Abbildung 26: Die DNA-Fragmente für das EMSA .....	54
Abbildung 27: Electrophoretic Mobility Shift Assay von EnuR und EnuR* .....	55
Abbildung 28: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der <i>lacZ</i> -Fusionen für die Reporteranalysen .....	57
Abbildung 29: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR7 [ $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$ ] .....	58
Abbildung 30: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR8 [ $\Delta(eutD::Gm)1$ ] .....	59

Abbildung 31: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR11 [ $\Delta(eutABC::Gm)1$ ] .....	60
Abbildung 32: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR10 [ $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] .....	61
Abbildung 33: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR9 [ $\Delta(ntrXY::Gm)1$ ].....	63
Abbildung 34: Beispiele der genetischen Anordnungen der Gencluster des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus.....	66
Abbildung 35: Die phylogenetische Verbreitung des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus.....	69
Abbildung 36: Die putative DNA-Bindesequenz von EnuR.....	86
Abbildung 37: Bindung von $\alpha$ -ADABA durch den Pyridoxal-5'-Phosphat-Cofaktor des EnuR-Transkriptionsregulator .....	89
Abbildung 38: Putative Hydrolyse von 5-Hydroxyectoin durch die Ornithin-Cyclodeaminase EutC und spontane Umlagerung .....	90
Abbildung 39: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der <i>lacZ</i> -Fusionen für die Reporteranalysen .....	93
Abbildung 40: Modell der Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-abhängigen Transkriptionsregulation des $P_{uehA}$ in <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.....	96
Abbildung 41: Quantitative Verteilung der Transkriptionsfaktoren .....	97
Abbildung 42: Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante in <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 .....	112
 Abbildung A1: Wachstum von <i>R. pomeroyi</i> -Kulturen auf Glucose.....	157
Abbildung A2: Katabolitrepression des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Stoffwechselweges in <i>R. pomeroyi</i> J470.....	158
Abbildung A3: Massenspektren von EnuR und EnuR* .....	159
Abbildung A4: Untersuchungen des Verhaltens von EnuR in der Thermophorese nach Zusatz verschiedener Liganden.....	160
Abbildung A5: Expressionsmuster der $P_{enuR^-}enuR^+-P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in <i>R. pomeroyi</i> ASR14 [ $\Delta(ssd-atf::Gm)1$ ].....	161
Abbildung A6: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoines/Ectoin-Substratbindeproteins (EhuB) des EhuABCD ABC-Transporters von <i>S. meliloti</i> .....	162
Abbildung A7: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoines/Ectoin-Substratbindeproteins (UehA) des UehABC TRAP-Transporters von <i>R. pomeroyi</i> DSS-3. ....	163
Abbildung A8: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Substratbindeproteins (TeaA) des TeaABC TRAP-Transporters von <i>H. elongata</i> .....	164
Abbildung A9: Aminosäuresequenzvergleich von EnuR-Typ MocR/GabR-Regulatoren .....	165
Abbildung A10: Aminosäuresequenzvergleich von AsnC-Typ Lrp/AsnC-Regulatoren .....	166
Abbildung A11: Aminosäuresequenzvergleich von NtrX-Typ Antwortregulatoren .....	167
Abbildung A12: Aminosäuresequenzvergleich von NtrY-Typ Sensorkinasen.....	168

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispielhafte Darstellung alternativer Stoffwechselwege für die Intermediate des Ectoinabbaus 2,4-Diaminobutyrat und L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd.....	76
Tabelle 2: Laborgeräte und Hilfsmittel .....	100
Tabelle 3: Chemikalien.....	101
Tabelle 4: Verwendete Kits .....	103
Tabelle 5: Verwendete Antibiotika .....	103
Tabelle 6: Verwendete Enzyme .....	103
Tabelle 7: Verwendete Standards.....	103
Tabelle 8: verwendete Datenbanken und Tools .....	103
Tabelle 9: 5-fach AP-Puffer.....	104
Tabelle 10: TE-Puffer .....	104
Tabelle 11: 10-fach TBE-Puffer .....	104
Tabelle 12: Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), flüssig .....	105
Tabelle 13: Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), fest.....	105
Tabelle 14: ½ YTSS .....	105
Tabelle 15: ½ YTSS, fest .....	105
Tabelle 16: 10 x Minimal Medium A (MMA) (273) .....	105
Tabelle 17: 1 x MMA (273).....	105
Tabelle 18: 5 x Minimal Medium 63 (M63) (370) .....	106
Tabelle 19: 5 x M63 mit 0,4 M NaCl (370) .....	106
Tabelle 20: Basalmedium für <i>R. pomeroyi</i> nach Baumann et al.(369) .....	106
Tabelle 21: Basalmedium für <i>R. pomeroyi</i> , fest (369) .....	106
Tabelle 22: 200 x Vitamin Mix A .....	106
Tabelle 23: 200 x Vitamin Mix B .....	107
Tabelle 24: Lösung 1 für die Herstellung komp. Zellen .....	107
Tabelle 25: Lösung 2 für die Herstellung komp. Zellen .....	107
Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Phusion-Polymerase PCR.....	109
Tabelle 27: Reaktionsverlauf der Phusion-Polymerase PCR .....	109
Tabelle 28: DNA-Probenpuffer.....	110
Tabelle 29: Waschpuffer für die Affinitäts-Chromatographie .....	114
Tabelle 30: Elutionspuffer für die Affinitäts-Chromatographie .....	114
Tabelle 31: Regenerationspuffer für die Affinitäts-Chromatographie .....	115
Tabelle 32: Puffer für die Größenausschlusschromatografie .....	115
Tabelle 33: Zusammensetzung von Trenngelen (380) .....	116
Tabelle 34: Zusammensetzung eines 4%igen Sammelgels (380).....	116
Tabelle 35: 4-fach 1D-SDS-Probenpuffer .....	116
Tabelle 36: 5-fach SDS-Laufpuffer .....	117
Tabelle 37: Puffer für das EMSA .....	117

Tabelle 38: Reinigungspuffer für die Thermophorese .....	118
Tabelle 39: MST-Puffer für die Thermophorese .....	118
Tabelle 40: Puffer für die CD-Spektroskopie .....	118
Tabelle 41: Puffer für die UV/VIS-Spektroskopie.....	118
Tabelle 42: Z-Puffer .....	119
Tabelle 43: Kalium-Phosphat-Puffer .....	119
Tabelle 44: ONPG-Lösung.....	119
Tabelle 45: 20x SSC (DEPC).....	121
Tabelle 46: Maleinsäurepuffer (DEPC) .....	121
Tabelle 47: Waschpuffer (DEPC).....	121
Tabelle 48: Detektionspuffer .....	121
Tabelle 49: 10x MOPS-Puffer .....	121
Tabelle 50: Verwendete Primer .....	123
Tabelle 51: verwendete Plasmide .....	129
Tabelle 52: verwendete Bakterienstämme.....	131
Tabelle A1: Die Induzierbarkeit des <i>uehA</i> -Promotors in verschiedenen <i>R. pomeroyi</i> - Mutantenhintergründen .....	169



### 1. Zusammenfassung

---

Bakterien benötigen, wie alle lebenden Organismen, Nährstoffe um ihr Wachstum und Überleben zu sichern. Da Stickstoff bis zu 10 % der bakteriellen Trockenmasse ausmacht (1), stellt in den meisten Habitaten reduzierte Stickstoffverbindungen den limitierenden Wachstumsfaktor dar (2,3). Um diesem Stress entgegenzuwirken, haben Mikroorganismen die Fähigkeit entwickelt, ihren Metabolismus an das fluktuierende Angebot von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen anzupassen. Die stickstoffhaltigen Aminosäurederivate Ectoin und 5-Hydroxyectoin (4,5) sind osmotische Schutzsubstanzen, die von einer Vielzahl bakterieller Spezies synthetisiert und akkumuliert werden können (6,7). Durch aktive und passive Prozesse, wie Zelllyse, Diffusion und die Öffnung von Effluxsystemen gelangen diese kompatiblen Solute in das externe Medium (8–12). Auf der Erde wird jedoch keine natürlich produzierte, organische Verbindung akkumuliert, sondern wird entweder wieder in ihrer ursprünglichen Funktion in die Zelle aufgenommen oder aber dem mikrobiellen Metabolismus zugeführt (1). Eine wichtige sekundäre Funktion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin ist daher deren Nutzung als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle, entweder als zellinterne Reserve des produzierenden Bakteriums selbst oder als externes Substrate, das von anderen Mikroorganismen freigesetzt wird (8).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Katabolismus von Ectoinen durch das marine Bakterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 untersucht (13,14). Basierend auf der Hypothese eines katabolen Mechanismus für die Umwandlung von 5-Hydroxyectoin zu Ectoin und dem anschließenden Abbau zu L-Aspartat [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15)] wurden die physiologischen, genetischen und biochemischen Voraussetzungen des Katabolismus analysiert. Eine chromosomale Deletion des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf*-Operons verhinderte das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 auf sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Bioinformatische Analysen zeigten, dass diese Fähigkeit ausschließlich auf das Phylum der *Proteobacteria* beschränkt ist und einer hohen genetischen Diversität unterliegt. Durch 'Northern Dot Blot'-Analysen und Reporterfusionen wurde gezeigt, dass die Transkription des Genclusters sowohl von einem konstitutiven als auch von einem substratinduzierbaren Promotor erfolgt. Der MocR -Typ Transkriptionsregulator EnuR ist sowohl Repressor als auch Aktivator des vorliegenden Genclusters und ist neben seiner prosthetischen Gruppe Pyridoxal-5'-Phosphat auch von zwei Stoffwechselintermediaten als interne Induktoren abhängig. In dem katabolen Ectoin-Operon wird zusätzlich für den Transkriptionsfaktor, der 'feast-and-famine'-Familie, AsnC (16,17) kodiert, welcher neben EnuR für die Aktivierung des Promotors verantwortlich ist. Für die Aufnahme und den Katabolismus von alternativen Stickstoffquellen ist in vielen bakteriellen Organismen, so auch in *R. pomeroyi* DSS-3, unter anderem auch das NtrXY-Zweikomponentensystem (18,19) zuständig. Basierend auf biochemischen und genetischen Untersuchungen, wird ein Modell für die transkriptionelle Kontrolle des katabolen Ectoin- Genclusters beschrieben, welches von den zwei Transkriptionsregulatoren EnuR und AsnC und dem Zweikomponentensystem der generellen Stickstoffkontrolle NtrXY abhängt.

## 2. Summary

---

Like all living organisms, bacteria require nutrients to ensure survival and growth. These nutrients must contain the required chemical elements for the synthesis of cellular macromolecules and the activity of all enzymes and translocation systems. (1). Since 10 % of the dry mass of a bacterial cell consists of nitrogen (1), this element is often a limiting factor to growth of the bacterial cell (2,3). To counteract this stress, microorganisms have developed the ability to quickly adapt their metabolism to the fluctuating supply of different carbon and nitrogen sources.

The amino acid derivatives ectoine and 5-hydroxyectoine (4,5) are osmotic stress protectants that are widely synthesized and accumulated by a variety of bacterial and archaeal species (6,7). Through active and passive processes such as cell lysis, diffusion and the opening of transient efflux systems, compatible solutes are released into the external growth medium (8-12). In natural habitats, no naturally synthesized organic compounds are accumulated, but rather are reused or degraded by microorganisms. Therefore, an important secondary function of ectoine and 5-hydroxyectoine is their use as a carbon, nitrogen and energy source, either as an internal reserve of the producing strain or as an external substrate, which was released by other organisms (8).

The main focus of this study was on the catabolism of ectoines by the marine bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (13, 14). Based on the hypothesis of an enzymatic mechanism for the conversion of 5-hydroxyectoine to form ectoine and its subsequent degradation to L-aspartate (personal communication J. Heider; in 15), the physiological, genetic and biochemical requirements for the catabolism of ectoines were investigated. A chromosomal deletion of the *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf*-operon in *R. pomeroyi* DSS-3 abolishes the utilization of these compounds as carbon and nitrogen sources. Bioinformatics showed that the phylogenetic distribution of ectoine consumers is restricted to the *Proteobacteria* and the genetic arrangement of the corresponding genes is not evolutionarily conserved. Using Northern Blot analyses and reporter gene fusions I was able to show that transcription of the catabolic ectoine/5-hydroxyectoine operon in *R. pomeroyi* is governed by a constitutive as well as a substrate inducible promoter. The transcriptional regulator EnuR belongs to the MocR/GabR-subfamily of transcriptional regulators and is a repressor as well as an activator for the operon. Its dependence on the cofactor pyridoxal-5'-phosphate and on two intermediates of the catabolic route was shown. In addition to EnuR the transcriptional activator AsnC, belonging to the 'feast-and-famine' family of transcriptional regulators (16,17), is coded for in the catabolic Ectoine-operon. The uptake and catabolism of alternative nitrogen sources in bacteria depend on the general nitrogen control (Ntr-) system. In *R. pomeroyi* DSS-3 the NtrXY two-component system (18,19) is part of this Ntr system and as such, also involved in the regulation of Ectoin uptake and catabolism. Based on the biochemical and genetic analyses conducted here, a model for the transcriptional control of the catabolic gene cluster, comprising two transcriptional regulators and a two-component system of the general nitrogen control, was established.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Das marine Ökosystem

Das marine Ökosystem wird durch ein großes Spektrum von mikrobiellem Leben besiedelt. Dabei verändert sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften abhängig von dem vorliegenden Salzgradienten, ausgehend von dem offenen Ozean, hin zum Süßwasserzufluss im Mündungsgebiet, stetig (20–22). Der offene Ozean stellt ein oligotrophes Habitat mit einem geringen Zufluss von Nährstoffen dar. Aus diesem Grund ist die mikrobielle Verbreitung in diesen Bereichen, mit etwa eine Millionen Zellen je Milliliter in den oberen Schichten, eher gering (23). Das bekannteste und am weitesten verbreitete bakterielle Monophylum des Ozeans, die *Pelagibacterales* (24), zeichnet sich durch eine geringe Wachstumsrate und ein optimiertes Genom aus. Aufgrund dieser Eigenschaften gilt diese Gruppe als evolutionäre Spezialisten (25). Im Gegensatz dazu steht der vielfältige Lebensraum der Küstengewässer. Die Schwankungen verschiedenster biotischer und abiotischer Faktoren sind in diesem Habitat größer und fördern somit die evolutionsbedingte Verbreitung von Generalisten; solchen Bakterien, deren Genome die Möglichkeit bieten sich schnell an eine Reihe verschiedener Umwelteinflüsse anzupassen (25). Mit den Veränderungen der Umweltbedingungen, verändern sich auch die Zusammensetzungen der mikrobiellen Gemeinschaften (26). Zu der Gruppe der marinen Generalisten gehört unter anderem das Monophylum der *Roseobacter* (Familie der *Rhodobacteraceae*) (27–30). Eine Gruppe die phylogenetisch sehr einheitlich ist, aber in physiologischer und morphologischer Hinsicht eine hohe Diversität aufweist. Eine Tatsache die vermutlich auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen ist (28,31) und es den verschiedenen Spezies dieses Monophylums erlaubt, ein großes Spektrum an marinen Ökosystemen zu besiedeln. Dazu gehören unter anderem die polaren Eismeere (32), Biofilme in Küstennähe (33) oder die Fähigkeit Symbiosen mit Dinoflagellaten und Schwämmen einzugehen (34,35).

#### 3.2 Das marine Bakterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3

Die Gruppe der *Roseobacter* (27–30) ist von großer ökologischer Bedeutung, da sie unter günstigen Bedingungen bis zu 20 % der bakteriellen Besiedelung von marinen Küstengewässern ausmacht (28,36). Innerhalb dieser, in marinen Gewässern ubiquitär verbreiteten Gruppe hat sich das motile, gram-negative Bakterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (ursprünglich *Silicibacter pomeroyi* DSS-3) (13,37,38) zu einem bedeutenden Modelorganismus für eine Vielzahl physiologischer und ökologischer Prozesse etabliert. Isoliert wurde dieses mesophile, heterotrophe Bakterium erstmals im Mündungsgebiet vor der Küste von Georgia, USA (13,14,37). Das Genom dieses Alphaproteobacteriums besteht

aus einem zirkulären Chromosom (4.109.437 bp) und einem Megaplasmid (491.611 bp) mit einem G+C-Gehalt von 64,2 % beziehungsweise 62,8 % (14,39,40). Bereits die Genomsequenz von *R. pomeroyi* DSS-3 lässt vermuten, dass dieses Bakterium einen großen Einfluss auf eine Reihe biogeochemischer Prozesse hat. Dazu gehören unter anderem die Oxidation von Kohlenstoffmonooxid, der Abbau aromatischer Verbindungen und die Produktion von Sekundärmetaboliten (14). Die große metabolische Vielfalt dieses Bakteriums zeigt sich unter anderem in dem Katabolismus von Dimethylsulfoniopropionat (DMSP), dem am besten untersuchten Stoffwechselweg in *R. pomeroyi* DSS-3 (41–43). Diese Schwefel-Kohlenstoff-Verbindung wird hauptsächlich von Algen als Osmoprotektivum synthetisiert und ist ein wesentlicher Bestandteil des globalen Schwefelkreislaufs (44,45). Es kann von *R. pomeroyi* DSS-3 in einer salzabhängigen Art und Weise zu entweder Dimethylsulfid oder Methanthiol abgebaut werden (13,46,47).

### 3.3 Mikrobielle Anpassung an erhöhte Osmolaritäten

Das Überleben und die Vermehrung von Mikroorganismen hängt von deren Fähigkeit ab, sich an fluktuierende Bedingungen in ihrer Umwelt anzupassen. Zu diesen Bedingungen gehören neben der Verfügbarkeit von Nährstoffen, auch der pH-Wert, die Temperatur und die Osmolarität des Mediums. Die Konzentration wasserlöslicher Stoffe im Medium bestimmt die Menge an Wasser, die der bakteriellen Zelle zur Verfügung steht. Die Erhöhung der extrazellulären Konzentration gelöster Stoffe, setzt das chemische Potential des Wassers herab, was zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks führt (48). Dies führt im Folgeschluss dazu, dass das cytoplasmatische Wasser der bakteriellen Zelle im Vergleich ein höheres chemisches Potential als das Umgebungswasser besitzt. Im osmotischen Gradienten fließt Wasser grundsätzlich vom Ort des hohen Potentials zum Ort des niederen Potentials, wodurch das cytoplasmatische Wasser frei über die semipermeable Zellmembran diffundieren kann. Um das chemische Potential des cytoplasmatischen Wassers langanhaltend und effektiv herabzusetzen, akkumulieren Mikroorganismen osmotisch aktive Substanzen, die den Zellmetabolismus nicht beeinflussen (49–51). Für die zelluläre Protektion gegen hyperosmotische Gegebenheiten gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen der Anpassung: (i) die "salt-in"-Strategie und (ii) die "salt-out"-Strategie (52). Organismen, die die erste Strategie verfolgen, adaptieren die gesamte Proteinbiochemie ihres Cytoplasmas an die meist dauerhaft erhöhte Ionenstärke des Mediums. Dieser Mechanismus ist bisher jedoch nur für die Familie der *Halobacteriaceae*, die Ordnung *Halanaerobiales* und das Bakterium *Salinibacter rubrum* bekannt (53,54). Bis zu 7 M cytoplasmatisches KCl wurden dabei bereits in Spezies der *Halobacterien* beschrieben (55). Minimale Schwankungen der externen Osmolarität werden durch eine Anpassung der internen KCl-Konzentration im Cytoplasma ausgeglichen (56,57). Im Gegensatz dazu

akkumulieren Mikroorganismen, die sich mit Hilfe der "salt-out"-Strategie an erhöhte Osmolaritäten anpassen, als finale Stressantwort organische Moleküle ohne Nettoladung, so genannte kompatible Solute, um ein osmotisches Gleichgewicht mit dem externen Medium beizubehalten. Dabei bleibt das Cytoplasma weitestgehend frei von sowohl  $K^+$  als auch  $Cl^-$  und der Aufbau des Cytoplasmainshalts bleibt unverändert. Diese Art der Adaptation an schwankende Osmolaritäten des Mediums ist unter einer Vielzahl von Vertretern aller drei Domänen des Lebens (Archaeen, Bakterien und Eukaryoten) verbreitet (51,58).

### 3.3.1 Kompatible Solute

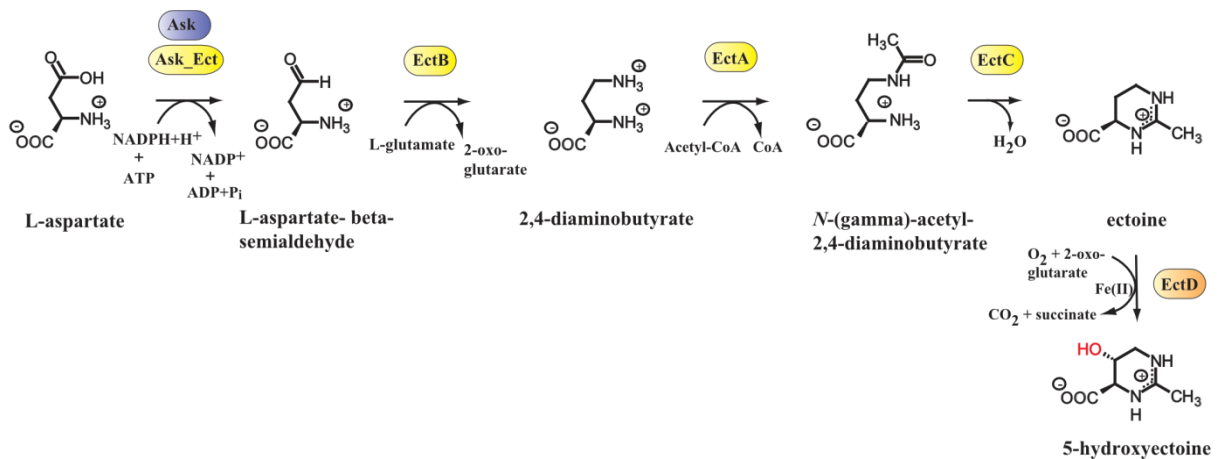
Kompatible Solute können in molaren Konzentrationen im Cytoplasma akkumuliert werden, ohne dabei in die physiologischen Prozesse der Zelle einzugreifen (59). Unter hyperosmotischen Bedingungen wirken die niedermolekularen Osmolyte dem Efflux von Wasser über die Cytoplasmamembran entgegen und stabilisieren so den Zellturgor, welcher essentiell für die Zellteilung und das Wachstum von Mikroorganismen ist (60,61). Neben der Eigenschaft als osmotische Schutzsubstanz zu wirken, zeichnen sich diese organischen Osmolyte zusätzlich darin aus, die Zelle vor Hitze und Kälte zu schützen, Nukleinsäuren zu stabilisieren oder die korrekte sekundäre und tertiäre Struktur von Proteinen zu sichern (62–64). Die Stabilisierung der Proteinfaltung kann unter anderem durch das Model der „*preferential exclusion*“ erklärt werden (65–67). Demnach werden kompatible Solute aus der direkten Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen, wodurch eine Entfaltung der Proteine einen höheren Energieaufwand und damit einen thermodynamischen Nachteil bedeuten würde. Das Protein ist gezwungen sein kleinstes mögliches Volumen einzunehmen, wodurch die native Konformation bevorzugt und die Hydratisierung des Proteins begünstigt wird (64,68). Oft werden kompatible Solute daher auch als "chemische Chaperone" (69) oder "Rückgrat-Chaperone" (70) bezeichnet. Da kompatible Solute nicht mit der Proteinoberfläche in Berührung kommen, wird die etwaige Enzymtätigkeit nicht beeinflusst (71,72). Es sind bereits viele kompatible Solute charakterisiert worden, welche alle einer geringen Anzahl von Molekülklassen zugeordnet werden können: (I) Aminosäuren und Derivate (z.B. Prolin, Glutamat, Ectoin); (II) Polyole (z.B. Glycerin, Trehalose); (III) Peptide (z.B. N-Acetylglutaminyl-Glutaminamid); (IV) Trimethylammonium-Verbindungen und deren Sulfonium-Analoga (z.B. Glycinbetain, DMSP); (V) Sulfatester (z.B. Cholin-O-Sulfat) (49,60,69,73). Die meisten Bakterien nutzen jedoch nicht nur ein kompatibles Solut, sondern bedienen sich, je nach Dauer der Stresssituation, Höhe der externen Osmolarität, Angebot an exogenen Soluten und der vorhandenen Kohlenstoffquellen, einer Reihe dieser osmotischen Schutzsubstanzen (74,75).

### 3.3.1.1 Die kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin

Zu der Klasse der Aminosäurederivate gehören auch die kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin (4,5), welche sowohl in marinen, als auch terrestrischen Mikroorganismen weit verbreitet sind (6,7,76). Wie andere osmotische Schutzsubstanzen auch, können das (6S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-6-Carboxylat und sein Hydroxyderivat bei Bedarf von bestimmten Organismen *de novo* synthetisiert (endogene Osmolyte), oder aus dem externen Medium über Transporter aufgenommen werden (exogene Osmolyte) (49,60). Im Gegensatz zu anderen zwitterionischen kompatiblen Soluten, wie Glycinbetain oder Prolin, schützen Ectoin und 5-Hydroxyectoin jedoch nicht nur auf Protein- sondern auch auf Zellebene, vor zum Beispiel UV-Strahlung, Cytotoxinen oder vor Nanopartikel-induzierten Entzündungen des Lungenepithels (72,74,79–82). Außerdem sind Ectoine in die Hitzeschutzantwort verschiedener Mikroorganismen involviert. So wurde bereits gezeigt, dass *Streptomyces griseus* 5-Hydroxyectoin als Antwort auf einen Hitzeshock akkumuliert und dass ein Verlust der Ectoin-Hydroxylase in *Chromohalobacter salexigens* zu einer erhöhten Hitzesensitivität führt (83,84). *Streptomyces coelicolor* hingegen erzielt durch ein Gemisch aus beiden Ectoinen den besten Schutz gegen erhöhte Wachstumstemperaturen (85). Trotz ihrer großen chemischen Ähnlichkeit, scheint die hydroxylierte Form des Ectoins ein größeres Spektrum an Schutzfunktionen auszufüllen. So konnten beispielsweise glasbildende Eigenschaften für 5-Hydroxyectoin, nicht aber für Ectoin, beschrieben werden, welche für einen Mechanismus gegen die Austrocknung von Zellen stehen (86). 5-Hydroxyectoin ist außerdem eines der Hauptmetabolite in Biofilmen, die aus saurem Grubenabwasser (acid mine drainage solutions) isoliert wurden (87). Diese schützenden Eigenschaften machen Ectoin und 5-Hydroxyectoin zu wertvollen Substanzen, die ihre Verwendung in gesundheitsfördernden Produkten und Kosmetika finden. Zum Zweck der industriellen Produktion dieser Zellprotektiva wird das halophile Proteobakterium *H. elongata*, ein natürlicher Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Produzent, unter hochsalinen Bedingungen fermentiert. Um die kompatiblen Solute zu isolieren, wird ein Prozess, der als 'bacterial milking' bezeichnet wird, angewandt. Dabei wird die Salinität des Mediums nach einer entsprechenden Wachstumsphase gesenkt, als Folge dessen die Bakterien ihre kompatiblen Solute in das Medium sekretieren. Diese werden über Filtersysteme isoliert und die Salinität des Mediums wieder angehoben, um die erneute Produktion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin zu fördern. Bis zu neun weitere dieser Zyklen können folgen und so mehrere Tonnen pro Jahr produziert werden (70,88).

### 3.3.1.2 Der Biosyntheseweg von Ectoin und 5-Hydroxyectoin

Die *de novo* Synthese von Ectoin beginnt mit einem Intermediat des allgemeinen Aminosäurestoffwechsels, L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd (89,90), welches im Folgenden in drei enzymatischen Reaktionsschritten zu Ectoin umgewandelt wird. Durch die Aktivität von EctB (L-2,4-Diaminobutyrat-Transaminase) wird L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd aminiert und es entsteht L-2,4-Diaminobutyrat, welches anschließend durch EctA (2,4-Diaminobutyrat-Acetyltransferase) zu N-(gamma)-acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat acetyliert wird. Im finalen Schritt entsteht mit Hilfe der Ectoin-Synthase (EctC) Ectoin (91–93) (Abb. 1). Eine nicht unwesentlichen Anzahl von Ectoin-synthetisierenden Mikroorganismen besitzen ebenfalls ein *ectD*-Gen (6,7). Dieses kodiert für die Ectoin-Hydroxylase, welche die stereospezifische Umwandlung von Ectoin zu 5-(S)- Hydroxyectoin katalysiert (6,94,95) (Abb. 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Synthese**

Ausgehend von L-Aspartat entsteht L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd durch eine Aspartokinase die entweder direkt mit dem Ect-Gencluster assoziiert (Ask\_Ect), oder an anderer Stelle im mikrobiellen Stoffwechsel kodiert ist (Ask). In den folgenden drei Schritten entsteht durch die Aufeinanderfolge der Enzymaktivitäten von EctB, EctA und EctC das kompatible Solut Ectoin. Durch eine spezifische Ectoin-Hydroxylase kann dieses zu 5-Hydroxyectoin umgewandelt werden. (90–92,94)

### 3.3.2 Kompatible Solute als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle

In marinen Gewässern sind Viren die am weitesten verbreitete biologische Einheit ( $\sim 10^{30}$ ) (96,97) und werden hauptsächlich von Phagen dominiert (98). Diese infizieren und lysieren bakterielle Zellen, wodurch der Inhalt des Cytoplasmas, und damit auch zuvor akkumulierte kompatible Solute, in das externe Medium freigesetzt wird (10,99). Zusätzlich unterliegt im marinen Habitat vor allem die Küstengewässer einer häufigen Veränderung von abiotischen Faktoren; im Falle von Regenfällen und im Mündungsgebiet von Süßwasserzuflüssen schwanken die osmotischen Bedingungen für die einzelne Bakterienzelle mitunter sehr stark.

Hypoosmotische Schocks führen dabei zu einem schnellen Ausstrom des cytoplasmatischen Zellinhalts über mechanosensitive Kanäle (11,100) oder auch nur von kompatiblen Soluten über spezifische Efflux-Systeme (Birch-Effekt) (12,101–103). Auch die passive Diffusion von kompatiblen Soluten über die Zellmembran und der Tod von mikrobiellen Zellen führt zu einer Anreicherung von kompatiblen Soluten im Wachstumsmedium (8,9,104). Diese Prozesse haben daher einen großen Einfluss auf das mikrobielle Nahrungsnetz, den Aufbau von Bakteriengemeinschaften und einer Vielzahl biogeochemischer Prozesse (105–107). Eine wichtige sekundäre Funktion von kompatiblen Soluten ist daher ihre Nutzung als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle, entweder als zellinterne Reserve des produzierenden Bakteriums selbst oder als externe Quelle, die von anderen Mikroorganismen freigesetzt wird. Viele bekannte Aminosäuren, wie Prolin, Glutamat und Alanin; sowie Zucker, wie Trehalose und Saccharose und andere Kohlenwasserstoffverbindungen wie Glycerol und Glycosylglycerol sind kompatible Solute und können gleichzeitig als Nährstoffquelle von vielen Bakterien, Actinomyceten und Microalgen genutzt werden (8).

### 3.3.2.1 Der Katabolismus von Glycinbetain

Das Aminosäurederivat GB beispielsweise wird sowohl von Pflanzen und Tieren, als auch Mikroorganismen als kompatibles Solut verwendet (108–110). Dessen weite Verbreitung ist der Abundanz seines metabolischen Vorläufermoleküls Cholin geschuldet, welches in Form von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin zwischen 50 und 90 % der eukaryotischen Plasmamembran ausmacht (111). Die enzymatische Oxidation von Cholin zu GB ist ein, in Prokaryoten und Eukaryoten gleichermaßen verbreiteter Reaktionsweg für die Synthese dieses kompatiblen Soluts (60). Auch die enzymatische Degradation von GB als Nährstoffquelle ist bereits gut verstanden. Das *Cyanobacterium Aphanothece halophytica* kann GB direkt nach einem Rückgang der erhöhten Osmolarität im Medium als interne Nährstoffquelle nutzen (112). Das Gammaproteobacterium *Halorhodospira halochloris* dagegen besitzt diese Fähigkeit nicht, sondern kann GB ausschließlich als Osmoprotektivum verwenden und muss es anschließend in des Wachstumsmedium sekretieren (113). Methanogene *Methanohalophilus*-Spezies dagegen können Trimethylamine, ein Endprodukt des GB-Abbaus durch homoacetogene Bakterien wie *Acetohalobium arabaticum*, verwenden um Methan zu produzieren (114). Zusätzlich gibt es eine Reihe weiterer Bakterien, die GB zwar nicht eigenständig synthetisieren können, diese Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindung aber zu katabolen Zwecken nutzen können; dazu gehören unter anderem Vertreter der Familie der *Rhizobiaceae* (115,116) oder der *Pseudomonadaceae* (76,117).



### 3.3.2.2 Der Katabolismus von Ectoinen

Gut untersucht sind auch die katabolen Reaktionswege der kompatiblen Solute Prolinbetain (118,119), DMSP (34,46,47,120) und von Disacchariden (121,122). Die Nutzung von Ectoin und 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle ist bisher jedoch nur unzureichend verstanden. So ist zum Beispiel bekannt, dass *Rhizobien* wie *Sinorhizobium meliloti* und *Rhizobium leguminosarum* unter hochosmolaren Bedingungen Ectoin aufnehmen, dieses jedoch nicht als osmotische Schutzsubstanz nutzen, sondern ausschließlich dem Katabolismus zuführen. Ectoin ist damit nur indirekt an der Osmoprotektion dieser Organismen beteiligt, indem das Aminosäurederivat als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle die Synthese von endogenen kompatiblen Soluten, wie Glutamat, unterstützt (116). Auch für *Pseudomonas putida* konnte gezeigt werden, dass es 5-Hydroxyectoin aufnimmt, es aber nicht zum Schutz vor erhöhten Salinitäten im Medium nutzen kann. Es wurde daher vermutet, dass es die heterocyclische Verbindung dem katabolen Stoffwechsel zuführt (123). Erstmals beschrieben wurden die Gene des katabolen Ectoin-Abbaucusters für *S. meliloti* (124). Im Rahmen dieser Studie wurden Ectoin-induzierbare Gene identifiziert und deren Genprodukte charakterisiert. Diese Proteine umfassen einen ABC-Transporter (EhuABCD; *ehu* ectoine/hydroxyectoine uptake) (125) sowie Enzyme des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus (EutABCDE; *eut* ectoine ut<sup>il</sup>ization) und einen Transkriptionsregulator der GntR-Superfamilie (126). Die dazugehörigen Gene befanden sich in einem Gencluster, dessen Transkription sich als substratinduzierbar erwies. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dessen Transkription nicht durch Veränderung der osmotischen Bedingungen des Wachstumsmediums reguliert wird (124). Ein ähnliches Gencluster konnte in dem marinen Bakterium *R. pomeroyi* DSS-3 (13,14,37) identifiziert und das Wachstum des Bakterium auf Ectoin und 5-Hydroxyectoin gezeigt werden. Anstelle eines EhuABCD-Typ ABC-Transporters (125) enthält dieses Gencluster jedoch einen TRAP-Transporter (UehABC; *ueh* uptake of ectoine and hydroxyectoine) (127). Durch einen Aminosäuresequenzvergleich zu den Ectoin-induzierbaren Genen von *S. meliloti* (124) wurde das Gencluster für den Katabolismus von 5-Hydroxyectoin und Ectoin auch im Genom von *Halomonas elongata* lokalisiert (128,129). Im Gegensatz zu den Ausführungen über die Gencluster von *R. pomeroyi* DSS-3 und *S. meliloti* (124,127), wird von den Autoren für *H. elongata* eine andere genetische Nomenklatur genutzt (*doe*ABXCD anstatt *eut*DE-*asnC*-*ssd*-*atf*). Auffällig ist, dass im katabolen Ectoin-Gencluster von *H. elongata* keine Transporter kodiert wird.

### 3.3.2.2.1 Das katabole 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Gencluster aus *R. pomeroyi* DSS-3

Das putative Gencluster des Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus in *R. pomeroyi* DSS-3 besteht aus 13 Genen (Abb. 2) (127). RT-PCR Analysen zeigten, dass das gesamte Gencluster als ein Operon transkribiert wird, wobei nicht auszuschließen ist, dass weitere kleinere Transkriptionseinheiten innerhalb des Operons existieren [persönliche Kommunikation N. Stöveken; in (15)]. Das erste Gen des Operons ist ein Transkriptionsregulator der GntR-Superfamilie (126). Dieses Regulatorgen wird im Folgenden als *enuR* (ectoine nutrient utilization regulator) bezeichnet (15). Im Operon werden zwei weitere Transkriptionsregulatoren kodiert. Der zweite Regulator nach *enuR* liegt direkt stromabwärts der Gene des Ueh-Transporters und gehört zur Familie der 'universal stress proteins' (130). Das letzte Regulatorgen befindet sich im katabolen Teil des Operons und gehört zu der Lrp/AsnC-Familie von Transkriptionsregulatoren (131,132).

Die übrigen zehn Gene des katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Operons lassen sich in drei funktionelle Einheiten unterteilen. Das erste Modul wird von den Genen des TRAP-Transporters (*uehABC*) gebildet (133). Den Anforderungen eines Transporters für die Substrataufnahme des bakteriellen Metabolismus entsprechend, ist die Aufnahme der Ectoine über dieses Transportsystem substrat- und nicht salzinduzierbar (127). Das zweite Modul umfasst drei Gene (*eutABC*) (Abb. 2) die vermutlich für die Umwandlung von 5-Hydroxyectoin zu Ectoin verantwortlich sind [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15)]. Die dritte funktionelle Einheit wird durch die Gene *eutDE-ssd-atf* gebildet (Abb. 2). Wie bereits für *H. elongata* (128) beschrieben, sind die daraus abgeleiteten Enzyme verantwortlich für die Hydrolyse des heterocyclischen Ectoinrings (EutD) und der anschließenden Umwandlung des entstehenden Intermediats zu L-Aspartat.



**Abbildung 2: Das katabole Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gencluster aus *R. pomeroyi* DSS-3**

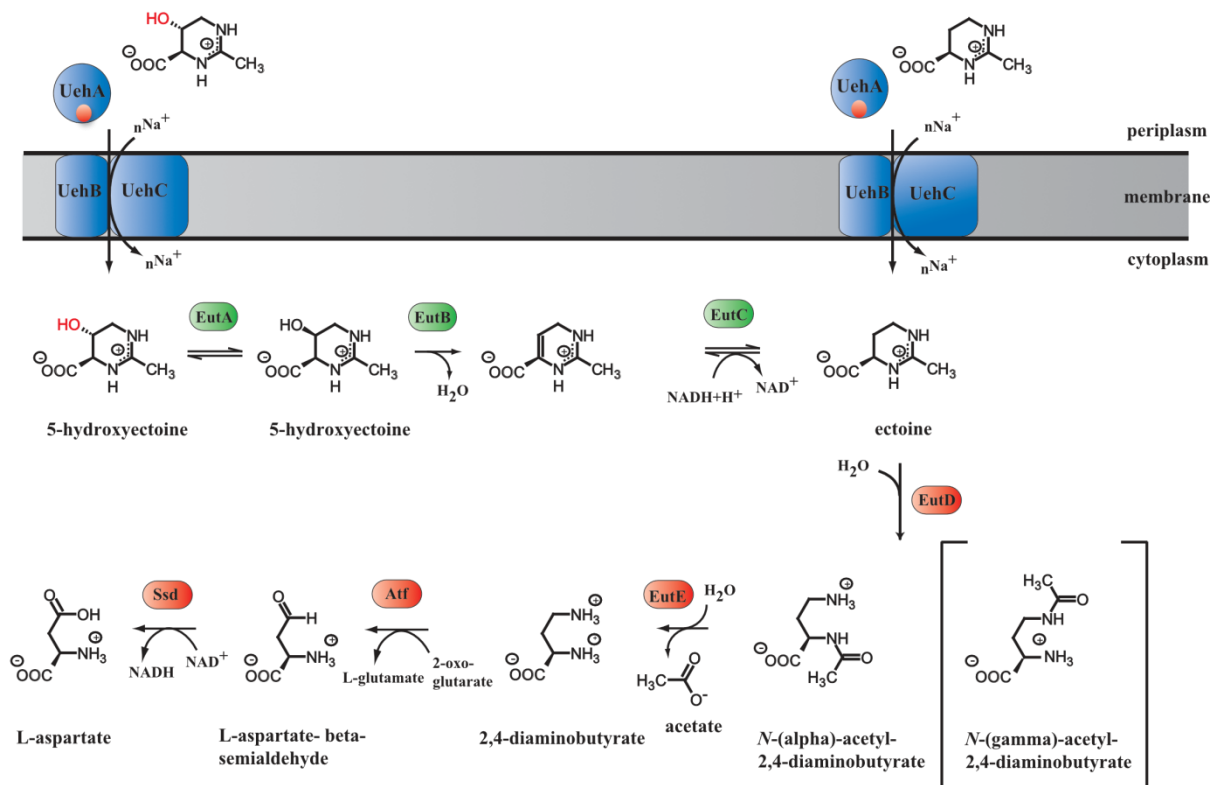
Dargestellt ist das *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Gencluster aus *R. pomeroyi* DSS-3. Die gelben Pfeile stellen Gene dar, die für Transkriptionsregulatoren kodieren. Blaue Pfeile stehen für die Gene des TRAP-Transporters. Grüne und rote Pfeile stehen jeweils für die Gene des 5-Hydroxyectoin- und des Ectoin-Abbaus (15).

### 3.3.2.2.2 Der vorgeschlagene Reaktionsweg des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaus zu L-Aspartat [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15)]

Datenbank- und Literaturanalysen führten zu einer funktionellen Annotation der möglichen Enzymfunktionen der *eutABCDE-ssd-atf*-Gene des putativen katabolen Ectoin-Operons aus *R. pomeroyi* DSS-3. Die Enzyme EutA, EutB und EutC sind in dem vorgeschlagenen Reaktionsschema verantwortlich für die Umwandlung von 5-Hydroxyectoin zu Ectoin (Abb. 3). Der erste Schritt in dieser Reaktionskaskade wird von EutA ausgeführt und vermittelt die stereospezifische Umwandlung des 5-(S)-5-Hydroxyectoins, das Reaktionsprodukt der Ectoinhydroxylierung durch EctD (94,95) (Abb. 1), zu 5-(R)-Hydroxyectoin (134–136). Die Enantiomerenbildung durch die Racemase EutA ist vermutlich abhängig von zwei konservierten Cysteinresten im Aktivenzentrum des Enzyms (Cys-94 und Cys-204), welche ebenfalls in verwandten Racemasen dieser Enzymklasse (pfam01177) der Fall ist (137–139). 5-(R)-Hydroxyectoin ist der Ausgangsstoff für den folgenden Reaktionsschritt durch EutB, ein putative Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängiges (Vitamin B6) Enzym, welches zu der Klasse der Threonin-Dehydratasen (pfam00291, superfamily cl00342) gehört (140,141). EutB katalysiert den Vorhersagen zu folge die Eliminierung der 5-Hydroxygruppe durch Abspaltung eines Wassermoleküls von 5-(R)-Hydroxyectoin und führt zur Bildung von 2-methyl-4,5-dihydropyrimidine-6-carboxylate (Abb. 3). Im Vergleich zu anderen bekannten Threonin-Dehydratasen besitzt EutB ebenfalls alle relevanten katalytischen Aminosäurereste im Aktivenzentrum, insbesondere das PLP-bindende Lysin-54 (140,142). Das entstehende Intermediat wird anschließend durch EutC zu Ectoin reduziert (Abb. 3). Dieses, als Ornithin-Deaminase annotierte, Genprodukt von *eutC* (pfam02423) agiert als "Ectoin-Dehydrogenase" und reduziert NADH-abhängig, die im vorherigen Reaktionsschritt entstandene C=C-Doppelbindung zu einer monovalenten Bindung. Hierbei handelt es sich um eine chemische Reaktion, die in dieser Art auch von anderen Enzymen dieser Klasse ausgeführt wird (140,143). Das so entstandene Ectoin und das durch den TRAP-Transporter aufgenommenes Ectoin werden in den folgenden Schritt gemeinsam durch die Enzyme EutD, EutE, Ssd und Atf zu L-Aspartat umgewandelt, welches über Oxalacetat wieder dem Zitronensäurezyklus zugeführt wird (144). Die folgenden Reaktionsschritte wurden bereits in anderen Arbeiten beschrieben und auf genetischer, sowie proteinbiochemischer Ebene teilweise verifiziert (124,128). Der heterocyclische Ring des Tetrahydropyrimidin-Derivats Ectoin wird durch die Ectoin-Hydrolase EutD geöffnet. EutD gehört zu der Familie der Xaa-Pro-Aminopeptidasen (pfam00557) (145,146). Die heterologe Expression des entsprechenden Gens aus *H. elongata* (*doeA*) führt dabei zu der Entstehung von zwei Reaktionsprodukten: (i) N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrate ( $\alpha$ -ADABA) und (ii) N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrate ( $\gamma$ -ADABA) im Verhältnis 2:1 (128). Letzteres ist ein Intermediat der Ectoinsynthese und entsteht durch die Acetylierung von 2,4-Diaminobutyrate

durch EctA (91,92) (Abb. 1). In diesem Zusammenhang muss daher angemerkt werden, dass *H. elongata* zur Synthese von Ectoinen befähigt ist und ein eigenständiges *ectABCD*-Gencluster (94,147) zur Synthese von sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin besitzt (128). Dieses biosynthetische Gencluster ist im Genom von *R. pomeroyi* DSS-3 nicht kodiert (14,39,40). Im Folgenden Reaktionsschritt wird die Acetylgruppe durch EutE hydrolytisch abgespalten, wodurch L-2,4-Diaminobutyrat entsteht. EutE gehört zu der Familie der Zn-abhängigen Deacylasen und Succinylglutamat-Desuccinylasen (pfam04952) (145,148,149). Eine Deletion des *eutE* (*doeB*)-Gens in *H. elongata* führt zu einer verstärkten Akkumulation von  $\alpha$ -ADABA gegenüber dem Wildtyp. Es ist daher wahrscheinlich, dass während des Ectoinabbau entstehendes  $\gamma$ -ADABA in *H. elongata* wieder der Ectoinsynthese zugeführt werden kann, während die EutE-Reaktion spezifisch für  $\alpha$ -ADABA ist (128) (Abb. 3). Die PLP-abhängige Aminotransferase (Klasse III) Atf (pfam00202) (150–152) katalysiert die Transaminierung von 2,4-Diaminobutyrat am C<sub>4</sub>-Atom, wodurch L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd entsteht. Dieses wird im finalen Reaktionsschritt durch Ssd zu L-Aspartat oxidiert. Ssd besitzt Homologien zu bekannten Succinatsemialdehyd-Dehydrogenasen (pfam00171) und ist damit abhängig von einem NADPH- oder NADH-Cofaktor (153,154).

Als Resultat des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus werden daher ein Acetat und ein Aspartat (in Form von Oxalacetat nach der Aspartataminotransferase-Reaktion) (155,156) in den Zitronensäurezyklus überführt. Zusätzlich entsteht ein Glutamat durch die Transaminierung des 2,4-Diaminobutyrats, welches unter anderem dem Stickstoffwechsel zugeführt werden kann (157) (Abb. 3).



**Abbildung 3: Putativer Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus in *R. pomeroyi* DSS-3**

Dargestellt ist der putative katabole Abbauweg von 5-Hydroxyectoin und Ectoin. In blau markiert sind die Proteine des UehABC-TRAP-Transporters, die den Transport der Substrate über die Zellmembran ermöglichen. Grüne Symbole kennzeichnen die Enzyme des putativen 5-Hydroxyectoin-Abbauweges und rote Symbole bezeichnen die Enzyme des folgenden Ectoin-Katabolismus [persönlichen Kommunikation J. Heider; in (15)]

### 3.4 Aktiver Stofftransport über die bakterielle Zellmembran

Die meisten Mikroorganismen können Nährstoffe und andere Substanzen nur in gelöster Form aufnehmen (59). Daher spielt die Zellmembran eine bedeutende Rolle in der Regulation der chemischen Komposition des Cytoplasmas (158–160). Die Zellmembran besteht hauptsächlich aus Lipiden (161) und kann von kleinen, ungeladenen Molekülen ungehindert passiert werden (162,163). Geladene und polare Moleküle dagegen sind von Transportproteinen abhängig, welche in ihrer Spezifität und Transportgeschwindigkeit variieren (164,165). So auch der Transport von Substraten, die als Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Energiequelle genutzt werden. Der aktive Transport von Stoffen kann über verschiedene Klassen von Transportern erfolgen. Da die Aufnahme von Nährstoffen einen schnellen und hochaffinen Transport erfordert, erfolgt dieser häufig mit Hilfe von Substratbindeproteinen (SBP), die mit einem Membranproteinkomplex assoziiert sind. SBPs wurden erstmals in Verbindung mit prokaryotischen ABC (ATP-binding cassette)-Transportern gefunden (166–170). Aber auch in prokaryotischen TRAP (tripartite ATP-

independent periplasmic transporters)-Transportern (133,171,172) und als Teil von Zweikomponentensystemen (173) sind sie weit verbreitet. SBPs variieren in ihrem Molekulargewicht (25 - 70 kDa) und haben untereinander eine geringe Sequenzidentität, in ihrer tertiären Struktur sind sie jedoch hoch konserviert. Sie bestehen aus zwei strukturell-konservierten Domänen (168), die über einen flexiblen Linker verbunden sind. Dieser Linker ermöglicht die geschlossene Konformation des Proteins nach Substratbindung (174). SBPs werden in einem hohen molaren Überschuss über die Membrandomänen in der Zelle produziert und binden ihre Substrate mit hoher spezifischer Affinität im niedrigen  $K_d$ -Bereich. Während des Bindevorgangs entfernen SBPs die Hydrathülle ihrer Liganden, ein Vorgang, der wahrscheinlich von großer Bedeutung für den folgenden Transportprozess ist (168).

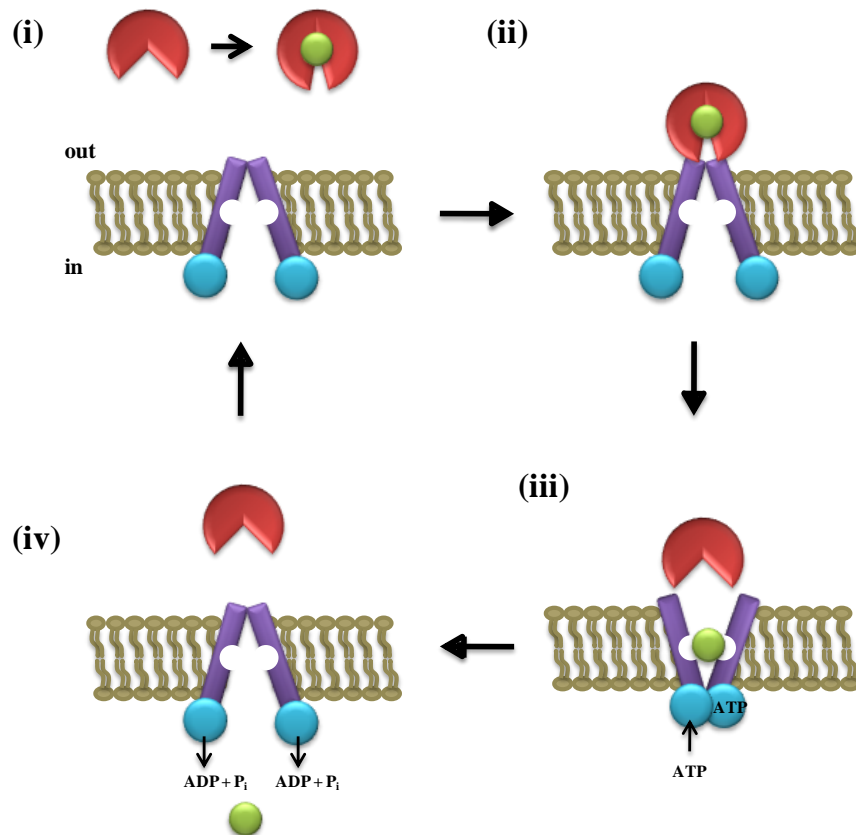
### **3.4.1 Die ATP-abhängige Translokation von Stoffen durch ABC-Transporter**

ABC-Transporter repräsentieren eine der größten Transmembranproteinfamilien des aktiven, primären Stofftransports. Sie existieren in allen drei Domänen des Lebens und können sowohl Importer als auch Exporter sein (175,176). Die Hauptcharakteristik dieser Transporterklasse besteht in der Hydrolyse von ATP, welches die Energie für den Stofftransport entgegen des Konzentrationsgefälles über die Lipiddoppelschicht der Zellmembran bereitstellt (177). Die Grundstruktur von ABC-Transportern setzt sich aus zwei Nukleotidbindedomänen (NBD) und zwei Transmembrandomänen (TMD) zusammen (178), wobei die Anzahl der membranspannenden Helices jeder TMD zwischen fünf und zehn liegt (179). Zusätzliche Domänen, wie Substratbindepoteine oder regulatorische- sowie katalytische Proteine, können sowohl an die NBD als auch die TMD fusioniert sein und verleihen dem Transportsystem zusätzliche, spezifische Funktionen (177,180). Die Klasse der "ATP-binding cassette"-Transporter sind in den verschiedensten Organismen in die Translokation einer Vielzahl verschiedener Substanzen beteiligt. Dazu gehören unter anderem Ionen, Zuckermonomere, Aminosäuren oder Antibiotika, aber auch große Moleküle, wie Oligosaccharide und -peptide (177).

#### **3.4.1.1 Transportmechanismus der ABC-Transporter**

Der Vergleich von Kristallstrukturen verschiedener ABC-Transporter und weitere Studien führte zu dem in Abbildung 4 dargestellten Transportmechanismus für den Translokationsprozess von Substraten unter der Verwendung von SBPs. Im ersten Schritt bindet das Substrat an das SBP, welches in die geschlossene Konformation übergeht. Anschließend bindet das geschlossene SBP an die TMD und gibt so das Signal für die kooperative Bindung von ATP an die NBDs. Die TMDs öffnen die Pore zum extrazellulären Raum hin und die SBD nimmt die offene Konformation ein. Das Substrat kann in den Kanal diffundieren. Durch die ATP-Hydrolyse dissoziieren die NBD von einander und die

Membranpore wird zum Zellinneren hin geöffnet. Das Substrat kann die Translokationspore verlassen und liegt dann im Cytoplasma vor (180).



**Abbildung 4: Translokationsmechanismus eines Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporters.**

Dargestellt sind die vier Schritte des Transportmechanismus eines Substratmoleküls mittels eines ABC-Transporters. Das Substratbindeprotein (SBP) ist in rot dargestellt, das Substrat in grün. Die Transmembrandomänen (TMD) sind durch lilafarbene Balken dargestellt und die Nukleotidbindedomäne (NBD) durch blaue Kreise. Die ATP-Bindung und Hydrolyse ist beschriftet ( $P_i = PO_4^{3-}$ ). (i) Substratbindung; (ii) Bindung der SBP an die TMD; (iii) Substratübergabe; (iv) Translokation. Diese Abbildung wurde aus (180) angepasst.

### 3.4.1.2 Ectoin-Transport in *Sinorhizobium meliloti*

Im katabolen 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-Gencluster von *S. meliloti* wird ein ABC-Transporter (EhuABCD) kodiert. Das *ehuA*-Gen kodiert für die Nukleotidbindedomäne, *ehuB* für das periplasmatische Substratbindeprotein. Die Permeasedomänen werden von *ehuC* und *ehuD* kodiert (124). Der Transport von Ectoin in *S. meliloti* erfolgt substratinduziert und geht zu 95 % von dem EhuABCD-System aus (116,124). Analyse der Kristallstrukturen des Substratbindeproteins EhuB mit entweder Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Liganden zeigten, dass die Bindung beider kompatibler Solute durch Kationen- $\pi$ -Interaktionen, sowie Salz- und

Wasserstoffbrücken von den gleichen Aminosäuren in der Substratbindetasche ausgeht (125). Das Bindeprotein weist eine Bindeaffinität von  $K_D = 0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$  gegenüber 5-Hydroxyectoin und Ectoin auf (116,124,125).

### **3.4.2 Die Translokation von Stoffen durch TRAP-Transporter erfolgt in Abhängigkeit der protonenmotorische Kraft**

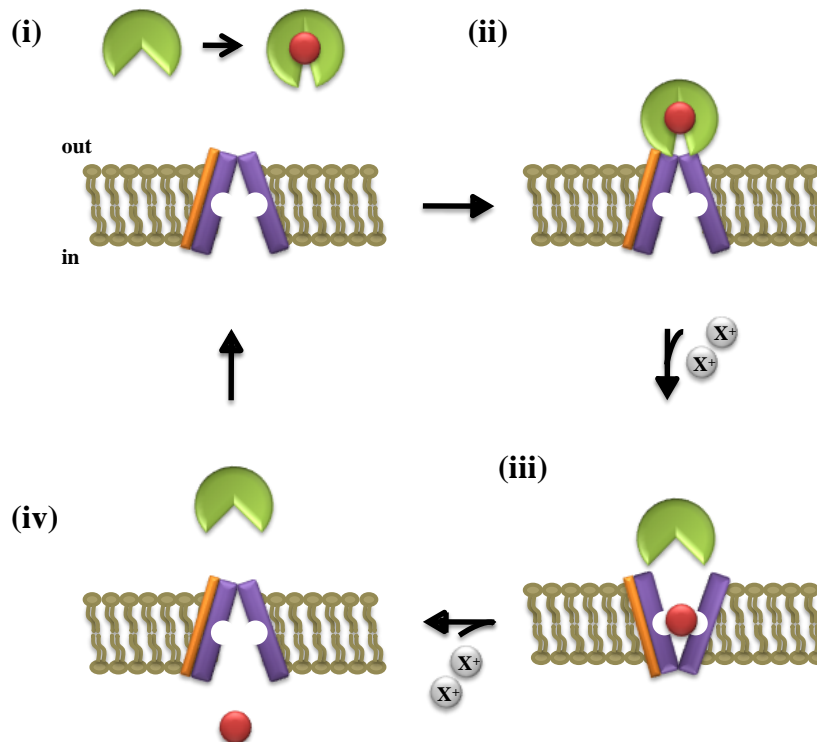
TRAP-Transporter sind bisher nur für Prokaryoten und Archaeen beschrieben worden (181,182). Im Gegensatz zu ABC-Transportern, sind die Vertreter der 'tripartite ATP-independent periplasmic transporters'-Klasse obligat auf ein periplasmatisches (gramnegative Bakterien) oder mit der Cytoplasmamembran verankertes (grampositive Bakterien) Substratbindeprotein angewiesen. Die Energiegewinnung für den Stofftransport erfolgt über einen elektrochemischen Ionengradienten, der protonenmotorischen Kraft (PMF) (181) und klassifiziert diese Art des Stofftransport damit als sekundär aktiv. Diese Gegenionen sind meist Natrium- oder Wasserstoff-Ionen, deren Transport über die Zellmembran thermodynamisch begünstigt ist (183). Daher ist diese Art von Transportern häufig in marinen Mikroorganismen zu finden, wo  $\text{Na}^+$ -Ionen im Überschuss vorhanden sind (184). TRAP-Transporter bestehen aus drei Proteinkomponenten. Neben der SBD wird die Translokationspore aus zwei Transmembranproteinen gebildet, die sich untereinander in ihrer Größe unterscheiden. In manchen Fällen, wird diese TMD aus nur einem Fusionsprotein gebildet, welches dann aus zwei eigenständigen Domänen besteht (185). Es wird angenommen, dass die größere der beiden Domänen für den Transport des Substrates und die Verlinkung zu der PMF verantwortlich ist. Während die Funktion der kleineren Untereinheit möglicherweise in die Interaktion mit dem SBP involviert ist (182,186). Es sind inzwischen viele TRAP-Transporter aus verschiedenen Organismen bekannt und gut charakterisiert. Trotz großer Diversität sind sie in dem Punkt vereint, dass ihre Substrate eine Carboxygruppe enthalten. Eine einzige Ausnahme wird von Taurin gebildet, in dem die Carboxygruppe durch eine Sulphonatgruppe ersetzt ist (127,133,172,187,188).

#### **3.4.2.1 Putativer Transportmechanismus**

Bisher gibt es keine experimentellen Daten, die den exakten TRAP-Transporter-vermittelten Translokationsmechanismus von Substratmolekülen erklären. Dennoch ist es möglich, über Modelle den putativen Translokationsmechanismus zu skizzieren (133). Wie in Abbildung 5 dargestellt, wird im ersten Schritt das Substratmolekül durch das SBP gebunden, welches in die geschlossene Konformation übergeht. Das geschlossene SBP interagiert mit der nach außen geschlossenen Translokationsdomäne, wodurch mindestens zwei externe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Ionen gebunden werden und die Konformationsänderung der Transmembrandomäne zur



nach außen geöffneten Form induziert. Das nach außen geöffnete Translokationssystem zwingt das SBP zurück in seine offene Konformation und vermindert so dessen Affinität zu dem Substrat. Das Substrat kann in die Pore diffundieren, welche daraufhin wieder die nach außen geschlossene Konformation einnimmt. Zu welchem Zeitpunkt jedoch die Bewegung der Gegenionen über die Membran erfolgt und so die benötigte Transportenergie freisetzt, ist bisher unklar (133).



**Abbildung 5: Putativer Translokationsmechanismus eines TRAP-Transporters**

Dargestellt sind die vier Schritte des Transportmechanismus eines Substratmoleküls mittels eines TRAP-Transporters. Das Substratbindeprotein (SBP) ist in grün dargestellt, das Substrat in rot. Die putative porenbildende Transmembrandomäne ist durch lilafarbene Balken und die kleinere der beiden Transmembrandomänen durch einen orangenen Balken dargestellt. Die Gegenionen sind mit  $X^+$  bezeichnet und werden als graue Kreise dargestellt. (i) Substratbindung; (ii) Bindung der SBP an die TMD; (iii) Substratübergabe; (iv) Translokation. Diese Abbildung wurde von (133) angepasst.

### 3.4.2.2 Ectoin-Transport in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 und *Halomonas elongata*

Der Transport von Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurde bisher in zwei Organismen untersucht. Der Ectoin-Transport des marinen Alphaproteobacteriums *R. pomeroyi* DSS-3 (14,37) erfolgt über einen TRAP-Transporter, der durch die *uehABC*-Gene kodiert wird und mit den Genen des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus in einem Operon liegt [N. Stöveken persönliche Mitteilung; in (15)]. Der Transport der Aminosäurederivate erfolgt nach Substratinduktion

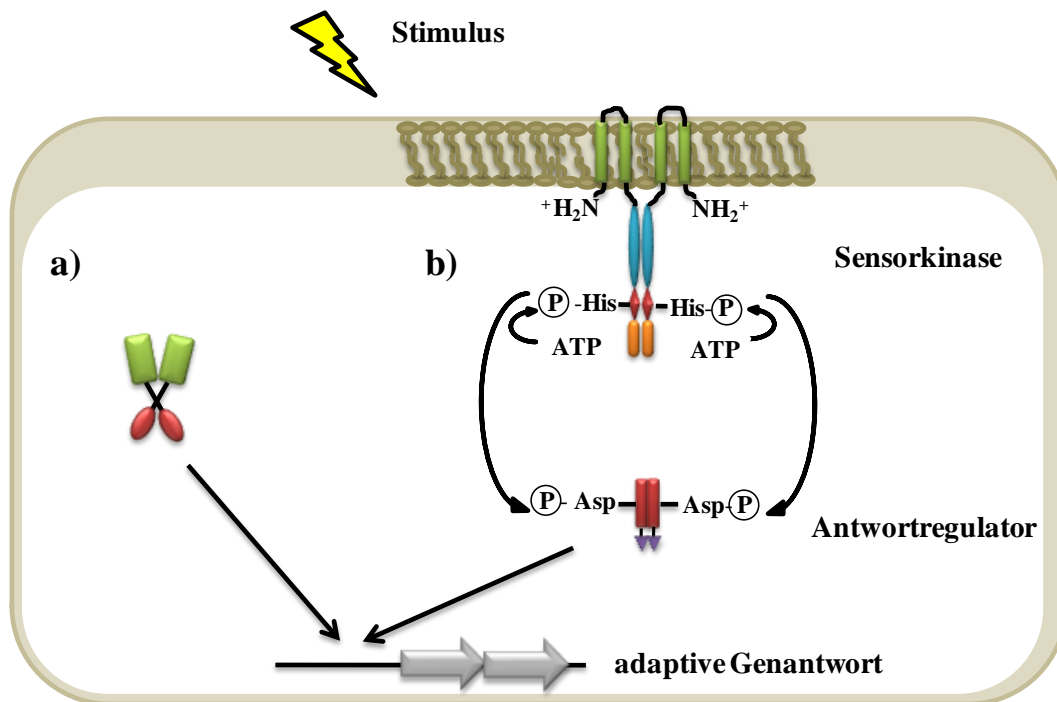
(15,127) (Abb. 2). In dem halophilen Bakterium *H. elongata* hingegen wird ein TRAP-Transporter durch die osmotisch induzierbaren *teaABC*-Gene kodiert. Während *R. pomeroyi* DSS-3 Ectoine aufnimmt um sie dem Zellmetabolismus zu zuführt, wird für *H. elongata* angenommen, dass es nicht nur exogenes Ectoin und 5-Hydroxyectoin aufnehmen kann, sondern auch dem hochaffinen Rücktransport von endogen synthetisiertem Ectoin und 5-Hydroxyectoin dient, welche aus der Zelle diffundierten (189,190). Die Substratbindepoteine beider Systeme haben eine 58 %ige Sequenzidentität und die strukturelle Organisation jener Aminosäuren, die mit dem Substrat interagieren, ist identisch (127). Dennoch liegt die Bindeaffinität von TeaA ( $K_d$  of  $0.19 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) für Ectoin fast 10-mal höher als die selbige von UehA ( $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ). 5-Hydroxyectoin hingegen wird von TeaA ( $3.8 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ) mit einer 3-fach geringeren Affinität gebunden als von UehA ( $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) (127,190). Diese Unterschiede sind möglicherweise auf ihre unterschiedlichen physiologischen Bedeutungen oder aber technische Abweichungen in der Versuchsführung zurückzuführen.

Wie für viele andere TRAP-Transporter auch beschrieben, folgen stromabwärts der Gene, kodierend für den TRAP-Transporter ein Gen, welches zur Familie der "universal stress proteins" (*usp*) gehört (130,133) (Abb. 2). Die tertiäre Struktur des entsprechenden Usp-Proteins (TeaD) aus dem TeaABC-Transportersystems aus *H. elongata* ist bekannt. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor der einen Einfluss auf die Ectoinaufnahme hat, dessen genauer Mechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte (191).

### 3.5 Bakterielle Anpassung an veränderliche Umwelteinflüsse

Bakterien sind in ihrem natürlichen Habitat einer Reihe von komplexen und fluktuierenden Bedingungen ausgesetzt. Um diesen Schwankungen zu begegnen, haben sie eine große Diversität an Anpassungsstrategien entwickelt (192,193). Generell erfolgt die Anpassung an Umwelteinflüsse durch die Modifikation der Genexpression oder durch posttranslationale Modifikationen, welche die Aktivität oder Stabilität von existierenden Proteinen beeinflusst. In Bakterien erfolgt diese Regulation meist auf Level der Transkription/RNA-Synthese, durch den Einfluss eines Regulators auf ein bestimmtes DNA-Element. Diese DNA-Bindeprotein-abhängige Regulation erfolgt über den Eingriff in die Transkriptionsinitiation, -elongation, -termination oder die Beeinflussung der RNA-Degradation (194,195). Die metabolische Adaptation von Mikroorganismen an eine Veränderung der Nährstoffzufuhr erfolgt meist auf dem Level der Transkriptionsinitiation. Die Transkription der entsprechenden Gene wird durch einen Transkriptionsfaktor aktiviert oder reprimiert (195,196). Repressoren können dabei entweder mit einem Transkriptionsaktivator um die gleiche DNA-Bindestelle konkurrieren, den Zugang der RNA-Polymerase zu ihrem Promotor verhindern oder stromabwärts von einem Promotor binden und somit die Transkriptionselongation verhindern

(197–199). Transkriptionsaktivatoren hingegen stabilisieren entweder den Polymerase-Promotorkomplex oder fördern die Ausbildung des offenen Komplexes (200).



**Abbildung 6: Einkomponentensysteme (a) und Zweikomponentensysteme (b)**

a) Dargestellt ist die Genregulation mittels eines Einkomponentensystems. In dem Transkriptionsfaktor sind Signaleingangsdomäne (grün) und die Signalausgabedomäne (rot) direkt in einem Protein aneinander fusioniert. b) Dargestellt ist die Genregulation mittels eines Zweikomponentensystems. Die membranspannenden Domänen sind grün dargestellt, die Sensordomänen blau, die Dimerisierungsdomäne rot und die ATPase-Domäne orange. Die Empfängerdomäne des Antwortregulators ist rot markiert, die Effektor-domäne desselben lila. Die konservierten Aminosäuren, welche phosphoryliert werden, sind markiert. Die übertragene Phosphatgruppe ist als eingekreistes "P" dargestellt. Der Stimulus wird von der Signaleingangsdomänen wahrgenommen. Dadurch wird die Affinität der finalen Signalausgabedomänen für ihre Operatorsequenzen im Promotor der Zielgene beeinflusst und so die Transkription der Gene verändert (201)

Die Anzahl der Transkriptionsfaktoren in einem Genom korreliert mit der Größe des Genoms eines Mikroorganismus und ist proportional zum Quadrat dessen Genanzahl (202,203). Je mehr Umweltschwankungen ein Organismus ausgesetzt ist, umso vielfältiger sind die benötigten Anpassungsmechanismen, dadurch nimmt die Größe des Genoms zu und mit diesem verbunden die Anzahl an Transkriptionsfaktoren zur Integration der verschiedenen Faktoren in den Lebenszyklus (202,203). Transkriptionsfaktoren vermögen es, die Verbindung zwischen einem spezifischen Umweltstimulus und der entsprechenden

Transkriptionsantwort entweder als Ein- oder als Zweikomponentensystem auszuführen (Abb. 6).

### 3.5.1 Einkomponentensysteme

Lange Zeit wurde angenommen, dass Zweikomponentensysteme das am weitesten verbreitete System der prokaryotischen Genregulation als Folge von Umwelteinflüssen sind. Erst der Vergleich von 145 bakteriellen Genomen zeigte, dass der Großteil der Signaltransduktionen über Einkomponentensysteme erfolgt. Einkomponentensysteme sind weiter verbreitet und evolutionär älter als Zweikomponentensysteme. Außerdem weisen sie eine vielfältigere Domänenstruktur auf, als ihre aus zwei Komponenten bestehenden Gegenstücke (203). In Einkomponentensystemen sind die Signaleingangsdomäne und die Signalausgabedomäne direkt in einem Protein fusioniert (Abb. 6) und stellen damit die einfachste Form der mikrobiellen Transkriptionsfaktoren dar (204). Die Signalausgabedomäne besitzt meist eine DNA-Bindfunktion in Form von zum Beispiel "zinc finger"-, "leucin zipper"- oder "helix-turn-helix"-Motiven (205). Die Fähigkeit DNA zu binden wird dabei durch die Signaleingangsdomäne beeinflusst. Letztere bindet meist kleine Effektormoleküle, die als Corepressor oder Induktor bezeichnet werden. Die Bindung dieser Signalmoleküle, die bei metabolischen Prozessen entweder das Substrat oder Produkt des Stoffwechselweges oder auch ein Intermediat sein können (206), beeinflusst die Orientierung der DNA-Bindemodule zueinander und somit die Affinität der Signalausgabedomäne für die Operatorsequenz auf der Ziel-DNA (207,208). Durch diese allosterischen Effekte kann die Affinität des Regulatorproteins zu DNA entweder erhöht oder reduziert werden (209,210). In anderen Beispielen konnte bereits gezeigt werden, dass erst die Bindung eines Effektormoleküls zur korrekten Assemblierung des Transkriptionsfaktors führt (207).

#### 3.5.1.1 Die helix-turn-helix Gruppe der GntR-Transkriptionsregulatoren

Das "helix-turn-helix" (HTH)-DNA-Bindemotiv ist in Transkriptionsregulatoren aller Domänen des Lebens weit verbreitet (211) und wird auf Grund von Sequenzidentitäten in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Eine dieser Untergruppen ist die GntR-Superfamilie, die nach dem Repressor des Gluconat-Operons in *Bacillus subtilis* benannt wurde (212,213). Die DNA-Bindedomäne ist innerhalb dieser Superfamilie strukturell hoch konserviert und besteht aus einem 3-Helixbündel und einem kleinen  $\beta$ -Sheet (wing). Die Effektorbinde- und Oligomerisationsdomäne (E-O), die an die winged-HTH anschließt, unterliegen einer größeren Heterogenität und wird daher genutzt um die GntR-Superfamilie in weitere Untergruppen einzuteilen (126). Es wird zwischen sieben GntR-Subfamilien unterschieden: FadR, HutC, MocR, YtrA, AraR, DevA und PlmA (214–216). Die Anzahl von GntR-

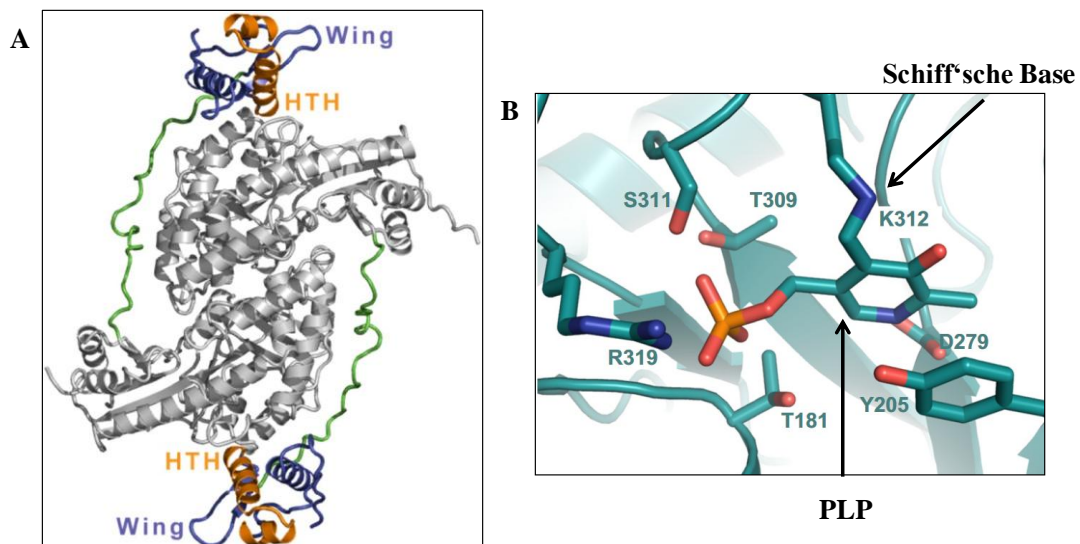
Regulatoren in einem Organismus hängt nicht nur von dessen Genomgröße ab, sondern auch von der besiedelten ökologischen Nische. Je komplexer der Lebensraum, desto mehr GntR-Typ Transkriptionsregulatoren werden im Genom kodiert um eine schnelle Anpassung an etwaige Umweltveränderungen zu ermöglichen (214).

### 3.5.1.2 Die MocR-Subfamilie der GntR-Typ Transkriptionsregulatoren

Die MocR-Subfamilie zeichnet sich durch die überdurchschnittliche Länge der Effektorbinde- und Oligomerisierungsdomäne von 350 Aminosäuren und deren Homologie zu Aminotransferasen der Klasse I aus (126,217,218). Sie sind innerhalb der Ordnung der Bakterien weitverbreitet, aber nicht in Archaeen beschrieben. Ob und in welcher Anzahl MocR-Typ Regulatoren in einem bakteriellen Genom vorkommen, ist jedoch sehr heterogen (219). Die enzymatischen Aminotransferasen der Klasse I sind im Allgemeinen als Dimere aktiv, in denen jede Untereinheit ein Molekül Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP; die aktive Form des Vitamins B<sub>6</sub>) über eine Aldiminbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines konservierten Lysins bindet (220). Mit Hilfe dieser prosthetischen Gruppe transferieren sie die primäre Aminogruppe einer Aminosäure auf die Ketogruppe einer Ketosäure (221). In vielen MocR-Typ Regulatoren sind die Aminosäuren für die Koordinierung des PLP-Cofaktors konserviert (219,222). Jedoch sind auch MocR-Typ Regulatoren bekannt, in denen eine oder mehrere dieser konservierten Aminosäuren durch andere Aminosäuren ausgetauscht sind. Für diese wird vermutet, dass sie möglicherweise nicht in der Lage sind PLP zu binden oder dieses unter Verwendung eines anderen Mechanismus koordinieren (219,223,224).

Einige MocR-Typ Regulatoren sind bereits näher beschrieben worden. Dazu gehören zum Beispiel PdxR aus *Listeria monocytogenes* und *Bacillus clausii* (223,225) oder TauR aus *Rhodobacter capsulatus* (226). Das strukturell und funktionell am besten charakterisierte Mitglied der MocR-Subfamilie ist aber GabR aus *B. subtilis* (227–231). GabR fungiert als Autorepressor gegenüber seinem eigenen Strukturgen, aber als Aktivator für das *gabTD*-Operon und ist so verantwortlich für den Stoffwechsel der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) (227–229). Die E-O-Domäne von GabR besitzt alle konservierten Aminosäuren, die für die Koordination eines PLP-Cofaktors notwendig sind (Abb. 7 B). Und tatsächlich ist die Aktivierung des *gabTD*-Operons von der Anwesenheit der prosthetischen Gruppe abhängig. GabR ist in der Lage eine Halbreaktion des Transaminierungszyklus zwischen PLP und GABA auszuführen. In diesem Reaktionsschritt, wird das interne Aldimin (Schiff'sche Base) zwischen dem Lysin des GabR und der Aldehydgruppe des PLP gelöst und stattdessen ein externes Aldimin mit der primären Aminogruppe des GABA gebildet. Dieser Komplex verbleibt im Aktivenzentrum des GabR-Moleküls, ist aber nicht mehr kovalent in der Effektorbindedomäne verankert (227). Die Umlagerung der Schiff'schen Base geht wahrscheinlich mit einer Veränderung der Orientierung der winged-HTH-Domäne

einher, welche daraufhin an ihre entsprechende DNA-Sequenz binden kann und so die Transkription von *gabTD* ermöglicht. Um eine vollständige Transaminierungsreaktion, wie bei Aminotransferasen bekannt, durchzuführen, müsste GabR in der Lage sein, eine entsprechende Ketosäure zu binden. Die Substratspezifität von Aminotransferasen der Klasse I wird durch zwei, im aktiven Zentrum lokalisierte, Argininreste determiniert (232–234). GabR besitzt einen dieser konservierten Argininreste, welcher die Bindung von GABA ermöglicht, nicht jedoch das zweite, welches  $\alpha$ -Ketoglutarat oder ein anderes Substrat der Transaminierung stabilisieren könnte (229–231). GabR ist daher nicht in der Lage einen vollständigen enzymatischen Reaktionszyklus auszuführen. MocR-Typ Transkriptionsregulatoren sind Beispiele für eine evolutionäre Entstehung von Transkriptionsfaktoren durch die Fusionierung einer DNA-Bindedomäne und einem Enzym, welches dann einen Teil seiner enzymatischen Aktivität verloren hat (235,236).



**Abbildung 7: GabR aus *B. subtilis***

(A) Dargestellt ist die quarternäre Struktur von GabR aus *B. subtilis*. GabR bildet ein 'head-to-tail' Homodimer. Die N-terminale Domäne der ersten Untereinheit interagiert dabei mit der C-terminalen Domäne der zweiten Untereinheit. Die Aminotransferasedomäne ist in grau dargestellt, der Linker in grün und die wHTH-Domäne in blau/organefarben. (B) Dargestellt ist die Amidbindung der Schiff'schen Base zwischen PLP und Lys-312 in der Effektorbindedomäne von GabR. Andere Aminosäuren, die an der Koordination von PLP beteiligt sind, sind markiert. Abbildung modifiziert aus (229)

### 3.5.1.3 Die Lrp/AsnC-Familie

Die Lrp/AsnC-Familie von Transkriptionsregulatoren, ist auch unter dem Namen der 'feast and famine' Familie bekannt. Der evolutionäre Ausgangspunkt für die Entstehung dieser Regulatorfamilie liegt noch vor der Divergenz zwischen Bakterien und Archaeen und ist daher bis heute in diesen beiden Domänen des Lebens weit verbreitet. Bisher wurden keine Hinweise auf diesen Typ Regulator in Eukaryoten gefunden (131,237). Lrp/AsnC-Typ Transkriptionsregulatoren sind DNA-Bindeproteine mit einer monomeren Größe von etwa 15 kDa. Die funktionelle Einheit entsteht erst durch ihre Oligomerisierung zu Dimeren, Tetrameren, Octameren oder auch Hexadecameren (238–243). Alle bisher untersuchten Lrp/AsnC-Transkriptionsregulatoren bestehen aus einer N-terminalen 'helix-turn-helix'-DNA-Bindedomäne, einem relativ langen Linker und einer C-terminalen Effektorbindedomäne. Im oligomeren Zustand zeigen die DNA-Bindedomänen nach außen und es wird angenommen, dass die entsprechende DNA mehrere Erkennungssequenzen trägt und so in einer Nukleosom-ähnlichen Struktur um das globuläre Protein gelegt wird (132,241,244,245). Vertreter dieser Regulatorfamilie binden eine Reihe von Aminosäure-Effektoren, wie L-Leucine, L-Glutamine, L-Alanine, L-Tyrosine, L-Tryptophane, oder L-Aspartate, die die entsprechende regulatorische Funktion beeinflussen (241,246,247). Dabei führt die Bindung eines Effektors entweder zur Assemblierung oder Deassemblierung des oligomeren Zustands oder verändert die DNA-Affinität der DNA-Bindedomäne (17,132,241). Sie beeinflussen den zellulären Metabolismus entweder global (Lrp) oder spezifisch (AsnC) (248) in einer Reihe von Prozessen, wie den Aminosäuremetabolismus, die Pili-Synthese, oder die DNA-Reparatur (131,249–251).

In *E. coli* wird die Expression des *asnC*-Gens über die Anwesenheit von Stickstoff reguliert. Unter Stickstoffmangel aktiviert das Ntr (nitrogen control)-System das Nac (nitrogen assimilation control)-Protein, welches dann die Expression von *asnC* reprimiert und so verhindert, dass die Argininsynthese erfolgt. Dies vermeidet einen übermäßigen Verbrauch von Stickstoff. Das Nac-Protein aktiviert unter anderem auch das *gabDTPC*-Operon von *E. coli*, welches unter limitierten Stickstoffbedingungen für den GABA-Transport und -Katabolismus verantwortlich ist (252). Diese Beobachtungen lieferten den ersten Hinweis, dass *asnC* auch unter dem Einfluss der allgemeinen Stickstoffkontrolle des Ntr (nitrogen regulatory)-Systems steht (253,254) (*vide infra*). Ein Einfluss, der zuvor bereits für mehrere Lrp-abhängige Gencluster gezeigt werden konnte (255,256).

### 3.5.2 Zweikomponentensysteme

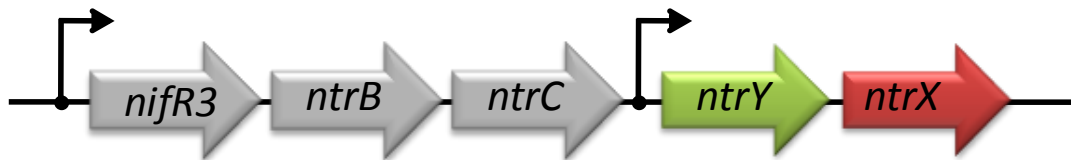
Signaltransduktionsprozesse können neben Einkomponentensystemen auch von Zweikomponentensystemen ausgeführt werden. Im Allgemeinen bestehen diese Zweikomponentensysteme aus einer Sensorkinase und einem dazugehörigen Antwortregulator (Abb. 6). Orthodoxe Sensorkinasen bestehen dabei aus drei Untereinheiten (Sensor-, Dimerisierungs- und katalytische Domäne) und nehmen je nach Aufbau bestimmte physikalische oder chemische Signale aus dem Cytoplasma, der Zellmembran oder dem periplasmatischen Raum der bakteriellen Zelle wahr. Die Reizeinwirkung bewirkt eine ATP-abhängige Autophosphorylierung eines konservierten Histidins in der Dimerisierungsdomäne. Diese energiereiche Phosphatgruppe wird auf ein konserviertes Aspartat in der, sowohl auf Sequenz- als auch auf Strukturebene hochkonservierten, Empfängerdomäne des Antwortregulator übertragen (Abb. 6). Diese Modifizierung verändert die biochemischen Eigenschaften der Signalausgabedomäne, welche daraufhin die designierte Funktion ausführen kann. Zu diesen gehören unter anderem die DNA-Bindung und transkriptionelle Kontrolle bestimmter Gene, aber auch enzymatische Funktionen oder Protein-Protein-Interaktionen (257). Zusätzlich zu der Kinaseaktivität weisen einige Sensorkinasen auch eine Phosphataseaktivität gegenüber ihrem Antwortregulator auf (258–260).

#### 3.5.2.1 Stickstoffkontrolle durch die Ntr-Zweikomponentensysteme

Ammonium-Ionen sind in den meisten Fällen die bevorzugte Stickstoffquelle von Bakterien. Dennoch müssen Mikroorganismen in bestimmten Ökosystemen ihren Metabolismus häufig auf alternative Stickstoffquelle einstellen und sind daher in der Lage, eine große Anzahl von Transportern für die Aufnahme und Enzymen für den Katabolismus anderer, stickstoffhaltiger Metabolite zu synthetisieren. Diese reichen von einfachen anorganischen Verbindungen, wie molekularem Stickstoff und Nitrat, zu komplexen Verbindungen, wie Aminosäuren und Nukleosiden (261). Die Regulation der Aktivität dieser Enzyme ist eng mit der Anwesenheit ihrer jeweiligen Substrate verbunden und unterliegt der Stickstoffkontrolle (262). Das globale Ntr-System besteht aus mehreren Enzymen und Transkriptionsfaktoren, zu welchem neben der Glutamatsynthase, auch das Zweikomponentensystem NtrBC gehört (Abb. 8). NtrB ist ein cytoplasmatisches Protein mit sowohl einer Histidinkinase-, als auch einer Phosphataseaktivität. Abhängig von der Stickstoffverfügbarkeit kann NtrB sich autophosphorylieren und eine Phosphatgruppe an seinen Antwortregulator (NtrC) weitergeben, oder aber als Phosphatase aktiv werden und so die schnelle Dephosphorylierung von NtrC~P ermöglichen. Phosphoryliertes NtrC aktiviert die Transkription einer Reihe von Genen und Operone, deren Genprodukte die



Glutaminsynthetase, Transporter, Aminosäurepermeasen und katabolische Enzyme umfasst, die gemeinsam das Überleben unter Stickstofflimitation ermöglichen (261,263,264).



**Abbildung 8: Zweikomponentensysteme der generelle Stickstoffkontrolle**

Dargestellt sind das *nifR3ntrBC*-Operon und die Gene des NtrYX-Zweikomponentensystems. Gene werden durch farbige Pfeile dargestellt. Die Promotoren der Operons sind durch gebogene Pfeile abgebildet. *ntrB* und *ntrY* kodieren für Sensorkinasen, *ntrC* und *ntrX* für die korrespondierenden Antwortregulatoren. Die Funktion des NifR3-Transkriptionsregulators ist bisher nicht vollständig verstanden (265). (19,266,267)

Es konnte bereits in mehreren Organismen gezeigt werden, dass stromabwärts des *nifR3ntrBC*-Operons ein weiteres Zweikomponentensystem kodiert wird (*ntrXY*) (18,267–269) (Abb. 8). Der Aufbau dieses Genclusters ist in allen *Alphaproteobacteria* konserviert kommt aber auch in anderen bakteriellen Phyla vor (266). In *S. meliloti* und weiteren Organismen überlappt das Startcodon des Histidinkinasegens *ntrY* mit der kodierenden Sequenz von *ntrC*. Das *ntrY*-Gen besitzt einen eigenen Promotor, aber auf Grund einer fehlenden Terminatorsequenz hinter *ntrC*, kann die Co-Transkription des gesamten Genclusters nicht ausgeschlossen werden (19,266,267). Für *Azospirillum brasilense* konnte gezeigt werden, dass das NtrXY-Zweikomponentensystem in der Lage ist, eine *nifR3ntrBC*-Deletion zu komplementieren (267). Eine mögliche Kommunikation zwischen den beiden Zweikomponentensystemen wurde ebenfalls mehrfach diskutiert, vor allem weil NtrY im Gegensatz zu dem cytoplasmatischen NtrB Transmembrandomänen besitzt, die möglicherweise auf eine Erkennung der relevanten Stimuli im extrazellulären Raum hinweisen (19,262,267,270). Spezifisch für das NtrXY-Zweikomponentensystem wurde in *Azorhizobium caulinodans*, *A. brasilense*, *S. meliloti* und *Brucella*-Spezies gezeigt, dass es in die Verwendung alternativer Stickstoffquellen, die symbiotische Knöllchenbildung, die Antwort auf Sauerstoffmangel und das Überleben im Wirtsorganismus involviert ist (18,266,267).

### 3.6 Zielsetzung

In vielen Bakterien spielen die Aminosäurerederivate Ectoin und 5-Hydroxyectoin eine wichtige Rolle. In ihrer Hauptfunktion sind sie weit verbreitete kompatible Solute und schützen so vor einer Reihe verschiedener Stressfaktoren, wie Salz und Hitze (7,76,83). In einer sekundären Funktion handelt es sich um effektive Nährstoffe, ins Besondere im Hinblick auf die zwei, im Heterozyklus enthaltenen Stickstoffatome (Abb. 1). Während die Synthese dieser osmotischen Schutzsubstanzen gut verstanden ist (91,147), ist der Katabolismus und dessen transkriptionelle Kontrolle noch unzureichend untersucht.

Basierend auf vorherigen genetischen und biochemischen Analysen des Ectoin- und 5-Hydroxyectoinkatabolismus in *S. meliloti* und *H. elongata* (124,128) wurde eine Hypothese für den katabolen Stoffwechselweg der Ectoine in *R. pomeroyi* DSS-3 aufgestellt. Erstmals bezog diese auch die Umwandlung von 5-Hydroxyectoin zu Ectoin mit ein [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15)]. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Hypothese mit Hilfe von physiologischen und genetischen Untersuchungen kritisch zu betrachten und die Funktionen der hypothetischen Genprodukte des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf*-Genclusters zu überprüfen. Außerdem wird die transkriptionelle Regulation des 15 kbp langen Operons, im Hinblick auf die relative Lage der Promotoren und dem Einfluss von Ectoin und 5-Hydroxyectoin auf deren Expression, betrachtet. In einem besonderen Fokus steht dabei die biochemische Charakterisierung des MocR/GabR-Typ Regulators EnuR und dessen Abhängigkeit von dem putativen Cofaktor PLP. Außerdem wurde der Einfluss des Zweikomponentensystems der generellen Stickstoffkontrolle, NtrXY, auf die Expression der katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gene untersucht. Ein erster Hinweis für die Beteiligung dieses Zweikomponentensystems am Ectoin-Katabolismus in *R. pomeroyi* DSS-3 ergab sich im Verlauf der Bachelorarbeit von T. Böning (2008) durch eine Transposon-Mutagenese. Das Heranziehen von bioinformatische Analysen soll Einblicke in die Verbreitung und die evolutionäre Konservierung des hier untersuchten Stoffwechselwegs geben.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen zum tieferen Verständnis des Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin und dessen phylogenetischer Verbreitung beitragen.

---

## 4 Ergebnisse

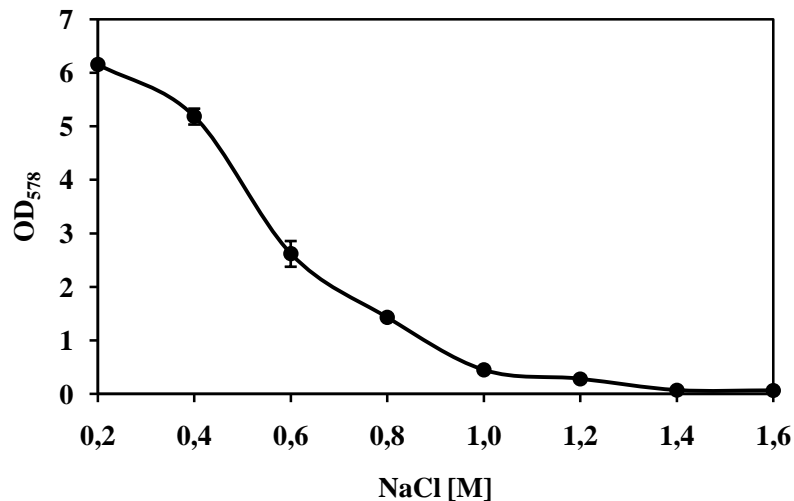
---

Ectoin und 5-Hydroxyectoin (4,5) sind osmotische Schutzsubstanzen, die von Vertretern 14 bakterieller und archaealer Phyla *de novo* synthetisiert werden können (6,7). Die weite Verbreitung in einer Vielzahl verschiedener Habitats macht diese Aminosäurederivate zu wertvollen Nährstoffen für andere Mikroorganismen oder den produzierenden Organismus selbst. Schwibbert et al. (2011) postulierten einen Reaktionsweg für den Katabolismus von Ectoin zu L-Aspartat über die DctABCD-abhängige Enzymkaskade. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte dieser katabole Ectoin-Abbauweg auch in *R. pomeroyi* DSS-3 identifiziert und beschrieben werden. Dabei wird in diesem Fall eine andere Nomenklatur für die beteiligten Genprodukte genutzt (EutDE-Atf-Ssd) (15). Im Rahmen dieser Studie konnte erstmals auch ein enzymatischer Abbauweg für 5-Hydroxyectoin postuliert werden, welcher in *R. pomeroyi* DSS-3 einer Enzymkaskade aus EutABC bedarf. Im Folgenden werden die physiologischen und genetischen Grundlagen des 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-Katabolismus in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 untersucht.

### 4.1 Osmoprotektion in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3

Um die Fähigkeit der Aufnahme und Akkumulation von externen kompatiblen Soluten zum Schutz vor erhöhter externer Salinität durch das marine Bakterium *R. pomeroyi* DSS-3 zu untersuchen, wurden zunächst das Wachstum des Mikroorganismus in Basalmedium mit Glucose und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle unter ansteigenden Osmolaritäten betrachtet. *R. pomeroyi* DSS-3 wurde in Medien mit sukzessiv ansteigenden NaCl-Konzentrationen (0,2 M bis 1,6 M) kultiviert und dessen Wachstumsertrag ( $\text{OD}_{578}$ ) nach 48 Stunden dokumentiert.

Abbildung 8 veranschaulicht die Toleranz des marinen Bakteriums *R. pomeroyi* DSS-3 gegenüber Schwankungen der Osmolarität. Das standardmäßig verwendete Medium hatte eine NaCl-Konzentration von  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Bereits bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration um  $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  zeigt *R. pomeroyi* DSS-3 ein deutlich verlangsamtes Wachstum und im Vergleich zum Ausgangsmedium einen um die Hälfte reduzierten Wachstumsertrag in der gleichen Zeitspanne. Wird die NaCl-Konzentration auf  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  erhöht, zeigt das hier untersuchte Alphaproteobakterium nach 48 Stunden nur noch ein schwaches Wachstum (Abb. 9).

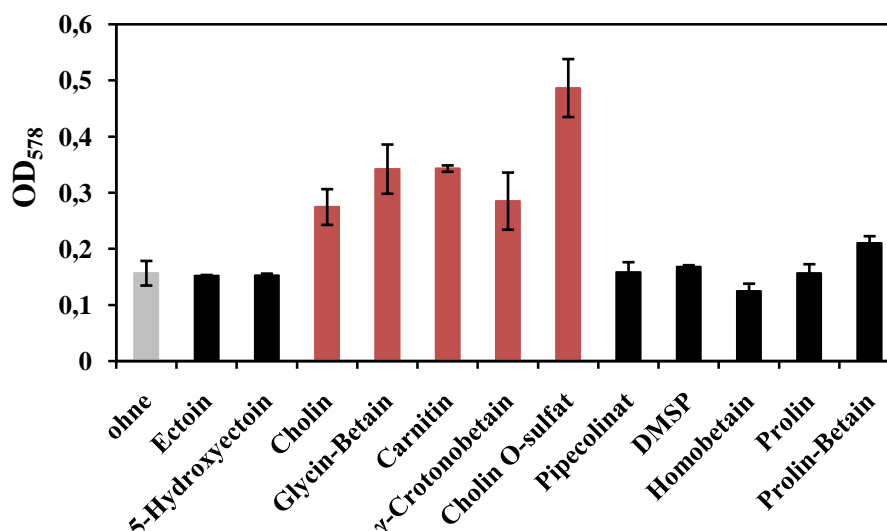


**Abbildung 9: Das Wachstum vom *R. pomeroyi* DSS-3 in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen**

Gezeigt ist das Wachstum des Wildtypstamms *R. pomeroyi* DSS-3 nach 48 h, welcher in Basalmedium mit steigender Salzkonzentration (0,2 M NaCl – 1,6 M NaCl in 200 mM Schritten) bei 30°C kultiviert wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

Diese letztere Bedingung wurden genutzt, um dem Medium verschiedene kompatible Solute (1 mM) zuzusetzen um deren Einfluss auf das bakterielle Wachstum unter Salzstress zu untersuchen. Nach 48 Stunden wurde die optische Dichte (OD<sub>578</sub>) aufgenommen und das Wachstum der Zellkulturen ohne und mit zugesetzten kompatiblen Soluten verglichen.

Der Zusatz von Cholin, Glycin-Betain, Cholin O-Sulfat,  $\gamma$ -Crotonobetain oder Carnitin führte zu einem verbesserten Wachstum des marinen Bakteriums unter erhöhten osmolaren Bedingungen. Neben Pipecolinat, DMSP, Homobetain, Prolin und Prolin-Betain können auch 5-Hydroxyectoin und Ectoin von *R. pomeroyi* DSS-3 nicht als osmotische Schutzsubstanzen genutzt werden (Abb. 10).



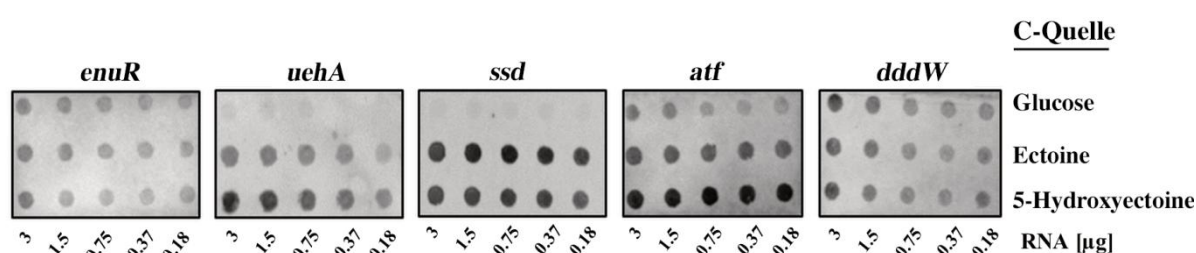
**Abbildung 10: Osmoprotektion von *R. pomeroyi* DSS-3 durch verschiedene kompatible Solute**

Dargestellt ist das Wachstum des Wildtypstamms *R. pomeroyi* DSS-3 nach 48 h, welcher in Basalmedium mit 1 M NaCl bei 30°C kultiviert wurde. Dem Medium wurden 1 mM verschiedenster kompatibler Solute zugesetzt. Der graue Balken markiert den Wachstumsertrag der Kultur, der keine Osmoprotektiva zugesetzt wurden. Rote Balken heben jene Kulturen hervor, die durch den Zusatz der kompatiblen Solute ein besseres Wachstumsverhalten aufweisen. Schwarze Balken stehen für jene Kulturen, die die im Medium vorhandenen kompatiblen Solute nicht aufnehmen können und daher keinen zusätzlichen Schutz erfahren. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

#### 4.2 'Northern Dot Blot'-Analysen zur Transkription verschiedener Gene des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Operons

Der UehABC TRAP-Transporter ist Teil des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons. Dessen substratinduzierte Aufnahme von Ectoinen in *R. pomeroyi* DSS-3 wurde bereits in früheren Studien gezeigt (127). Auch in *S. meliloti* konnten Ectoin-induzierte Proteine nachgewiesen werden, die möglicherweise in den Katabolismus von dieser osmotischen Schutzsubstanzen involviert sind (124). Ob die Expression der Gene, für welche vorausgesagt wird, dass sie in *R. pomeroyi* DSS-3 verantwortlich für den 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-Katabolismus sind, ebenfalls substratinduziert sind, wurde mittels 'Northern Dot Blot'-Hybridisierungsstudien ermittelt. Um den potentiellen Anstieg der Transkription der beteiligten Gene zu untersuchen, wurde *R. pomeroyi* DSS-3 in Anwesenheit und Abwesenheit von 5-Hydroxyectoin und Ectoin kultiviert und anschließend die gesamte RNA isoliert. Um den Level der Transkription zu bestimmen, wurden die zwei ersten (*enuR* und *uehA*) und die zwei letzten Gene (*ssd*, *atf*) des Operons mittels markierter RNA-Sonden detektiert. Hierbei wird deutlich (Abb. 11), dass die Transkription des *enuR*-

Gens auf einem sehr niedrigen Level und unabhängig von den zur Verfügung stehenden Substraten erfolgt. Im Gegensatz dazu erfährt die Transkription der *uehA*, *ssd* und *atf*-Gene eine starke Induktion, wenn sich entweder Ectoin oder 5-Hydroxyectoin im Wachstumsmedium befinden. Die Transkription des *R. pomeroyi* DSS-3 DMSP-Lyase-Gens *dddW* wurde ebenfalls in Abhängigkeit von externen Ectoinen untersucht. DddW ist Teil des Katabolismus des kompatiblen Soluts DMSP (43). Dieses Experiment diente der Kontrolle des Versuchsaufbaus, da für die Transkription dieses Gens keine Ectoinabhängigkeit zu erwarten war. Tatsächlich erwies sich die Expression des *dddW*-Gens als unbeeinflusst von der Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin oder Ectoin im Wachstumsmedium (Abb. 11).



**Abbildung 11: Transkriptionelle Kontrolle des *R. pomeroyi* DSS-3 *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons**

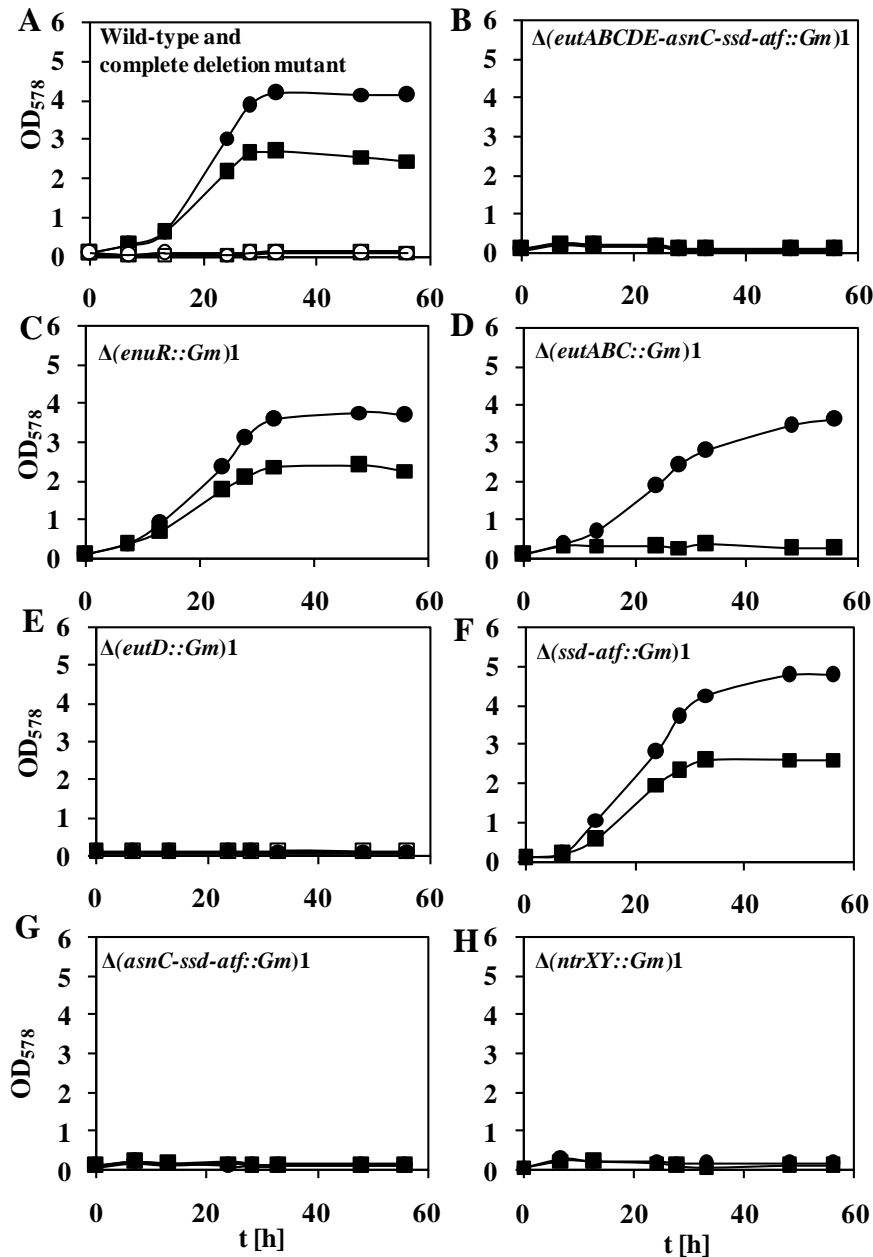
Abgebildet sind die Northern Dot-Blot Analysen der Transkriptionslevel von *enuR*, *uehA*, *ssd*, *atf* und *dddW*. *R. pomeroyi* DSS-3 wurde in Basalmedium mit entweder Glucose, Ectoin, oder 5-Hydroxyectoin (je 28 mM) kultiviert und die gesamte RNA extrahiert. Eine serielle Verdünnungsreihe dieser RNA wurde auf eine Nylonmembran aufgebracht und mit DIG-markierten, Gen-spezifischen anti-sense RNA-Sonden hybridisiert. Als Kontrolle diente das *dddW*-Gen des DMSP-Katabolismus in *R. pomeroyi* DSS-3 (43).

#### 4.3 Der Einfluss verschiedener chromosomaler Deletionen auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 mit Ectoinen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle

Um zu beweisen, dass das *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon für den Katabolismus von 5-Hydroxyectoin und Ectoin verantwortlich ist, wurde eine chromosomale Deletion (Abschnitt 6.2.8.5, Abb. 42) des gesamten Genclusters [ $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] erstellt. Dafür wurde das gesamte Gencluster durch eine nicht-polare Gentamycin-Kassette (persönliche Kommunikation I. Lidbury, UK) ersetzt und im Anschluss das Wachstumsverhalten des resultierenden Stammes ASR6 im Vergleich zu dem Rifampicin-resistenten Wildtypstamm *R. pomeroyi* J470 untersucht. Letzterer ist in der Lage, sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen. Die Deletionsmutante *R. pomeroyi* ASR6 hingegen hat diesen Phänotyp verloren und kann beide Ectoine nicht verstoffwechseln (Abb. 12 A). Um zu zeigen, dass dieser

Phänotyp nicht zustande kommt, weil der 5-Hydroxyectoin/Ectoin-spezifische Transporter UehABC (127) aus dem Genom entfernt worden war, wurde ebenfalls eine Deletion erstellt, die ausschließlich die katabolen Gene in Verbindung mit *asnC* [ $\Delta(\text{eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm})1$ ] umfasst. Eine Wiederholung der Wachstums-versuche (Abb. 12 B) führte zu der gleichen Beobachtung. Wie in *H. elongata* und *S. meliloti* (124,128) zuvor beschrieben, ist auch das hier untersuchte *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon (Abb. 2) aus *R. pomeroyi* DSS-3 verantwortlich für den Katabolismus von Ectoin. Besonders hervorgehoben sollte dabei werden, dass dieses Operon ebenfalls für die Verstoffwechselung von 5-Hydroxyectoin entscheidend ist, eine Beobachtung, die in bisherigen Studien nicht untersucht worden war. Um auszuschließen, dass die Erstellung der Deletionsmutante und die damit verbundene Insertion der Gentamycin-Kassette in das Genom nicht zu einer generellen Wachstumsstörung von *R. pomeroyi* DSS-3 im Basalmedium führt, wurde stets eine Kontrollkultur mit Glucose und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle mitgeführt. Diese zeigten jedoch keine Veränderung in ihrem Wachstumsverhalten (Abb. A1). Diese Wachstumskontrollen wurden auch für alle weiteren untersuchten Deletionsstämme mitgeführt, wiesen jedoch keine phänotypischen Veränderungen auf. Aus diesem Grund wird hier auf die Darstellung dieser verzichtet.

Wie in den 'Dot Blot'-Analysen (Abb. 11) beschrieben, erfolgt die Transkription des ersten Gens des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons substratunabhängig. Die Co-Transkription des gesamten Genclusters ausgehend von dem *enuR*-Promotor [persönliche Mitteilung N. Stöveken, in (15)], lässt vermuten, dass EnuR eine besondere Rolle in der Regulation der Genexpression des vorliegenden Operons einnimmt. Bekannte MocR/GabR-Typ Regulatoren (126,228) sind sowohl als Aktivatoren als auch als Autorepressoren beschrieben (224,226,227). Um die Funktion von EnuR auf das Operon zu untersuchen, wurde eine  $\Delta(\text{enuR}_{1-975::\text{Gm}})1$ -Mutante konstruiert (Stamm ASR7), welche die ersten 975 bp des 1395 bp langen Gens aus dem Chromosom entfernt. Wie in Abb. 12 C dargestellt, weist diese jedoch keinen Wachstumsphänotyp im Vergleich zum *R. pomeroyi* Wildtypstamm (Abb. 12 A) auf. Es ist daher anzunehmen, dass EnuR im Gegensatz zu seinen bereits beschriebenen Orthologen (224,226,227) vermutlich kein Aktivator ist.



**Abbildung 12: Wachstumskurven des Rif<sup>R</sup> Wildtypstamms *R. pomeroyi* J470 und diverser Mutantenstämme**

*R. pomeroyi* J470 und Mutanten, in denen verschiedene katabole oder regulatorische Gene des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons deletiert wurden, wurden in Basalmedium mit entweder 5-Hydroxyectoin (Quadrate) oder Ectoin (Kreise) als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle kultiviert. Die Substratkonzentration betrug 28 mM. (A) Wachstum des Wildtypstammes *R. pomeroyi* J470 (geschlossene Symbole) und der  $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ -Mutante *R. pomeroyi* ASR6 (offene Symbole) (B) Wachstum von *R. pomeroyi* ASR 12  $\Delta(eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$  (C) Wachstum des *R. pomeroyi*-Stammes ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$  (D) Wachstumskurven des Stammes *R. pomeroyi* ASR11  $\Delta(eutABC::Gm)1$  (E) Wachstum von *R. pomeroyi* ASR8  $\Delta(eutD::Gm)1$  (F) Wachstum des Mutantenstammes *R. pomeroyi* ASR14  $\Delta(ssd-atf::Gm)1$  (G) Wachstum von *R. pomeroyi* ASR10  $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$  (H) Wachstum des *R. pomeroyi*-Stammes ASR9  $\Delta(ntrXY::Gm)1$



Die detaillierte Beschreibung der putativen Reaktionsschritte des 5-Hydroxyectoin und Ectoin-Abbaus in *R. pomeroyi* DSS-3 umfasst die Bildung von Ectoin aus 5-Hydroxyectoin durch die enzymatischen Reaktionen der Genprodukte von *eutA*, *eutB* und *eutC* [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15)] (Abb. 3). Die Bestätigung dieser Hypothese konnte durch eine genomische Deletion der entsprechenden Gene in *R. pomeroyi* DSS-3 erbracht werden. *R. pomeroyi* ASR11 [ $\Delta(eutABC::Gm)1$ ] ist in der Lage, Ectoin als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu nutzen, hat jedoch die Fähigkeit verloren, gleiches für 5-Hydroxyectoin zu tun. Die Enzyme EutA, EutB und EutC sind daher in der Tat verantwortlich für die Verstoffwechselung von 5-Hydroxyectoin. Sie nehmen aber keinen Einfluss auf den Katabolismus von Ectoin durch *R. pomeroyi* DSS-3 zu Energiegewinnungszwecken (Abb. 12 C).

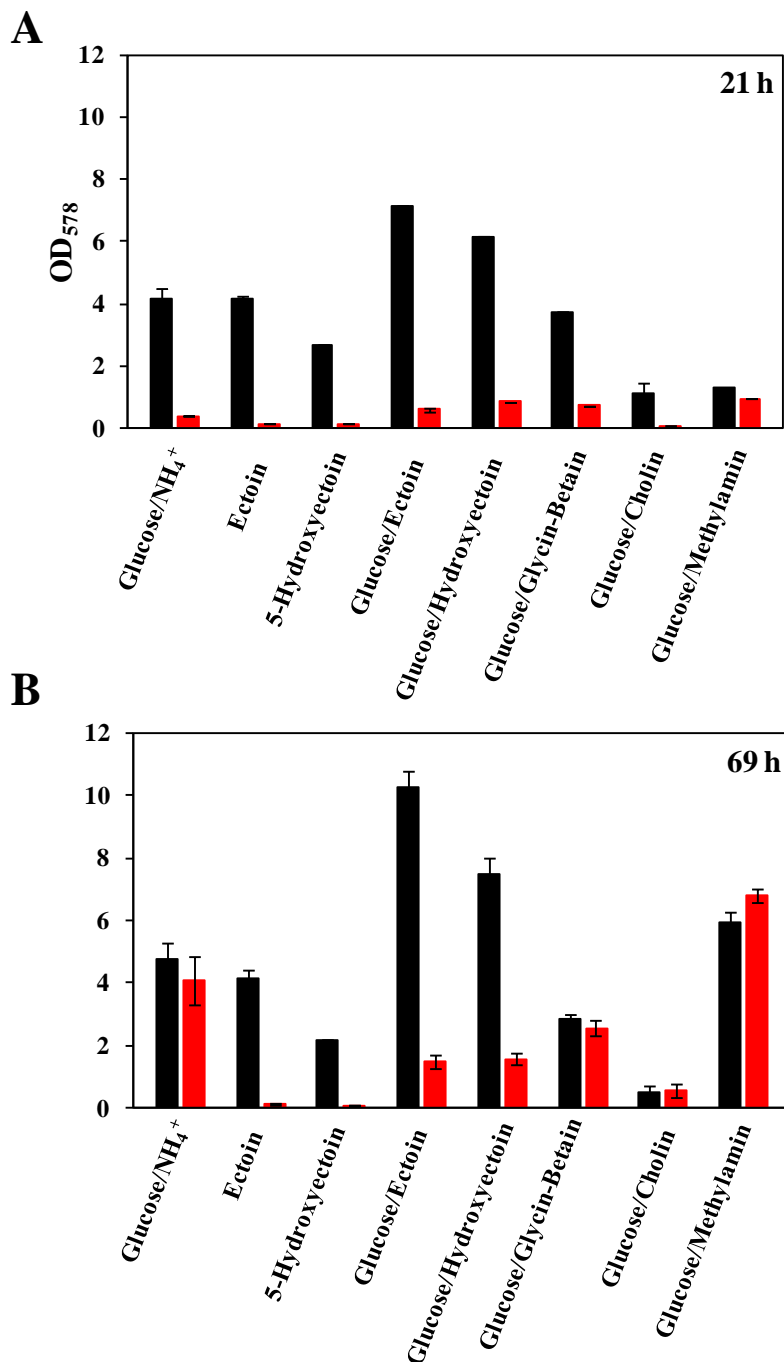
Bereits von Schwibbert et al. (2011) wurde ein Reaktionsweg für den enzymatischen Abbau von Ectoin zu L-Aspartat postuliert. In diesem, wie auch in der in Abbildung 3 beschriebenen Enzymkaskade [persönliche Mitteilung H. Heider; in (15)], stellt die Hydrolyse des heterocyclischen Ectoin-Rings durch das EutD-Enzym die Schlüsselreaktion dar. In *R. pomeroyi* DSS-3 sollte eine Deletion des entsprechenden Gens daher zu einem Verlust des Wachstums auf sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin führen. In der Tat erwies sich die  $\Delta(eutD::Gm)1$ -Mutante (Stamm ASR8) als nicht in der Lage, Ectoin und sein 5-Hydroxy-Derivat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen (Abb. 12 E). Dies entspricht den Beobachtungen von Schwibbert et al. (2011) für eine entsprechende Mutante in *H. elongata*.

Die letzten zwei enzymatischen Schritte des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus werden durch die Enzyme Atf (Acetylornithin-Aminotransferase) und Ssd (Succinatsemialdehyd dehydrogenase) katalysiert (15,124,128). Eine chromosomale Deletion dieser beiden Gene, wie sie im *R. pomeroyi*-Stamm ASR14 [ $\Delta(ssd-atf::Gm)1$ ] vorliegt, führt zu keinem erkennbaren Wachstumsphänotyp (Abb. 12 F). Durch die benannten Enzyme erfolgt die Umwandlung von L-2,4-Diaminobutyrat zu L-Aspartat und Glutamat. Dabei entstehen L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd als Zwischenprodukt (Abb. 3) (15,128). Es handelt sich hierbei um Kohlenwasserstoffverbindungen, die unter anderem auch im Aminosäuremetabolismus von beispielsweise Glycin, Serin und Threonin vorkommen und daher wieder dem allgemeinen Metabolismus zugeführt werden können (144). Wird das im Operon unmittelbar stromaufwärts-gelegene Gen *asnC* (Abb. 2) in die Deletion mit eingebunden, wie es für den *R. pomeroyi*-Stamm ASR10 [ $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] erfolgt ist, so ist ein Wachstum auf Ectoinen als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nicht mehr möglich (Abb. 12 G). Dieser Transkriptionsregulator der Lrp/AsnC-Familie (249) scheint eine wichtige Funktion in der transkriptionellen Kontrolle des katabolen *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*

Genclusters zu übernehmen und wie einige seiner bekannten Orthologe ein Transkriptionsaktivator zu sein (16,271).

Im Rahmen der Bachelorarbeit von T. Böhning (2008) wurden mittels Transposonmutagenese-Studien das Zweikomponentensystem NtrXY (19,267) als möglicherweise wichtig für den Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus identifiziert. Eine klare Aussage war zu dem Zeitpunkt dieser Untersuchungen jedoch nicht möglich, da neben der Tn-Insertion in *ntrXY* auch Tn-Insertionen in anderen Regionen des Chromosoms vorlagen (272). Eine gezielte genomische Deletion dieses Systems (Stamm ASR9; [ $\Delta(ntrXY::Gm)1$ ]) konnte die Vermutungen aus der früheren Studie bestätigen (Abb. 12 H). Der Katabolismus von Ectoinen in *R. pomeroyi* DSS-3 ist direkt abhängig von einem funktionellen NtrXY-Zweikomponentensystem. Das *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon steht daher unter Transkriptionskontrolle durch den Antwortregulator NtrX.

Im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass eine  $\Delta(ntrXY)$ -Mutante nicht in der Lage ist 5-Hydroxyectoin oder Ectoin zu katabolisieren, wurde untersucht, ob diese Mutation des Stickstoffsensors zu einer generellen Unfähigkeit führte, bestimmte Stickstoffquellen effektiv zu nutzen. Um die NtrXY-Abhängigkeit bestimmter Stoffwechselwege zu testen, wurden der *R. pomeroyi*-Wildtypstamm J470 und *R. pomeroyi* ASR9 [ $\Delta(ntrXY::Gm)1$ ] in Basalmedium mit entweder 5-Hydroxyectoin oder Ectoin als gleichzeitige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder mit Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Stickstoffquellen (NH<sub>4</sub>Cl, Ectoin, 5-Hydroxyectoin, Cholin, GB, Methylamin) kultiviert. Die OD<sub>578</sub> wurde nach 21 und nach 69 Stunden gemessen. Wie in Abbildung 13 A dargestellt, führt der Verlust des NtrXY-Zweikomponentensystems unter allen getesteten Bedingungen nach 21 Stunden Kultivierungsdauer zu einem deutlichen Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Nach 69 Stunden hingegen (Abb. 13 B) ist dieses Defizit unter jenen getesteten Bedingungen wieder ausgeglichen, die alternative Stickstoffquellen zu Ectoin und 5-Hydroxyectoin enthielten. Der Wildtypstamm tritt früher in die stationäre Phase ein als die  $\Delta(ntrXY)$ -Mutante. Somit hat die vorliegende chromosomale Deletion einen Einfluss auf die Wachstumsrate, jedoch nicht auf den finalen Wachstumsertrag. Liegen jedoch 5-Hydroxyectoin oder Ectoin als Substrate vor, ist auch der Wachstumsertrag deutlich eingeschränkt. Das Wachstum auf Ectoinen als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ist vollständig inhibiert. Sind diese Aminosäurederivate nur als Stickstoffquelle vorgesehen, ist ein schwaches Wachstum zu verzeichnen. Dieses liegt jedoch auch nach 69 Stunden weit unter dem des Wildtyps. Das NtrXY-Zweikomponentensystem nimmt daher eine wichtige regulatorische Funktion gegenüber dem katabolen Ectoin-Operon ein.



**Abbildung 13: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf das Wachstum von *R. pomeroyi* ASR9**

Der Rif<sup>R</sup> Wildtypstamm *R. pomeroyi* J470 (schwarze Balken) und die  $\Delta(ntrXY)$ -Mutante (*R. pomeroyi* ASR9) (rote Balken) wurden in Basalmedium mit entweder 5-Hydroxyectoin oder Ectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder mit Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Stickstoffquellen kultiviert. Die optische Dichte der Kulturen wurde nach 21 Stunden und nach 69 Stunden bestimmt.

#### 4.4 Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle des katabolen *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons

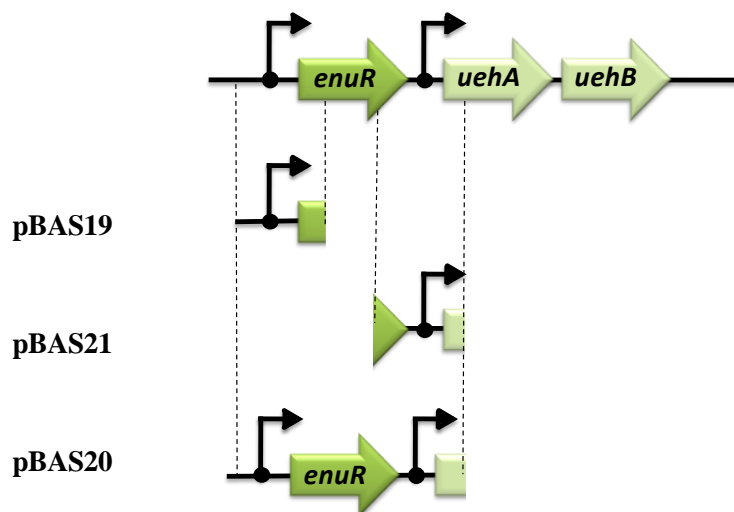
Aus den vorliegenden Wachstumsdaten des Rif<sup>R</sup> *R. pomeroyi* J470 und seiner beschriebenen Derivate (Abb. 12), wird deutlich, dass drei unterschiedliche Transkriptionsregulatoren Einfluss auf die Expression des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons oder Teile von diesem nehmen. Zwei dieser Regulatoren (EnuR und AsnC) werden im vorliegenden Operon selbst kodiert (Abb. 2). Das Zweikomponentensystem NtrXY hingegen ist an anderer Stelle im Genom zu finden. In Abbildung 10 konnte mittels Dot Blot-Analysen bereits gezeigt werden, dass die Transkription des *enuR*-Gens substratunabhängig erfolgt, die des *uehA*-Gens jedoch erst bei Anwesenheit von Ectoin oder 5-Hydroxyectoin im Medium aktiviert wird. Dies impliziert, dass die Transkription von *enuR* und *uehA* von unterschiedlichen Promotoren erfolgen muss. Um diese putativen Promotoren zu identifizieren, deren Stärke zu quantifizieren und die Einflüsse der zwei Regulatoren und des Zweikomponentensystems zu bestimmen, wurden Reporterfusionen konstruiert und unter verschiedenen Bedingungen getestet.

Als Reportergen wurde *lacZ* genutzt. Ein *E. coli*-Gen, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) kodiert. Wird das Enzym im Wirtsorganismus exprimiert, ist es in der Lage, das synthetische Substrat *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu hydrolysieren. In Folge dieser Reaktion entstehen Galaktose und *o*-Nitrophenol. Dabei handelt es sich um einen gelben Farbstoff dessen Absorption spektrophotometrisch bestimmt werden kann. Die Menge an *o*-Nitrophenol, die je Zeiteinheit gebildet wird, ist proportional zu der Konzentration von  $\beta$ -Galaktosidase in der Probe und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Stärke des Promotors (273). Die entsprechenden putativen Promotorregionen wurden in den pBIO1878-Vektor (43) kloniert und die resultierenden Plasmide (Tab. 58) durch Konjugation in den Rif<sup>R</sup> *R. pomeroyi* Wildtypstamm J470 oder eines seiner Derivate (Tab. 59) eingebracht. Es wurden verschiedene genetische Hintergründe untersucht, um deren Einfluss auf die Promotoraktivitäten zu analysieren. Das pBIO1878-Plasmid ohne Insertion wurde in den Experimenten mitgeführt und ebenfalls im LacZ-Assay eingesetzt. Es ergab sich in jedem Fall eine Basalaktivität von  $1,5 \pm 1$  Miller Units (MU).

##### 4.4.1 *enuR* und *uehA* werden von verschiedenen Promotoren exprimiert

Das *enuR*-Gen und das *uehA*-Gen werden trotz nachgewiesener Co-Transkription [persönliche Mitteilung N. Stöveken; in (15)] von unterschiedlichen Promotoren transkribiert (Abb. 11). Die Lage der putativen Promotoren sind in Abb. 14 graphisch dargestellt. Für jeden dieser möglichen Promotoren wurde eine *lacZ*-Fusion (auf Plasmid pBAS19 und

pBAS21) erstellt. Eine weitere Fusion enthielt beide Promotoren und das vollständige *enuR*-Gen (Plasmid pBAS20) (Abb. 14).

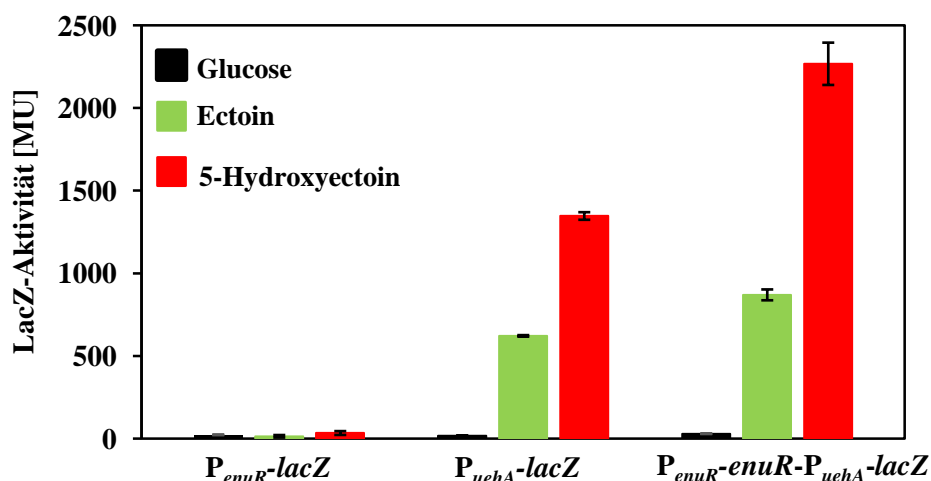


**Abbildung 14: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der *lacZ*-Fusionen für die Reporteranalysen**

Dargestellt ist die schematische Organisation der 5'-Region des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons. Die zwei putativen Promotoren, die für die Reporteranalyse genutzt wurden sind als gebogene Pfeile dargestellt. Die Abgrenzungen für die Reportergenfusionen sind mit gestrichelten Linien markiert. Die Bezeichnung des aus der Fusion resultierenden Plasmids ist angegeben.

Die *lacZ*-Reportergenfusionsplasmide wurden in *R. pomeroyi* J470 konjugiert. Die erhaltenen Stämme wurden in Basalmedium mit entweder Glucose und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle kultiviert und bei  $\text{OD}_{578} = 1 \pm 0,2$  in der exponentiellen Phase geerntet. Diese Proben wurden im LacZ-Assay eingesetzt und die Promotoraktivitäten bestimmt. Im Wildtyp-Hintergrund zeigt die  $P_{enuR}$ -*lacZ*-Fusion (auf Plasmid pBAS19) eine niedrige ( $23 \pm 10$  MU) konstitutive Expression der Gene ausgehend von dem Promotor vor *enuR* (Abb. 14; Tab. A1). Wie bereits in den Dot Blot-Analysen gezeigt werden konnte, erfolgt die Transkription von *enuR* substratunabhängig (Abb. 11). In Abwesenheit der Substrate Ectoin und 5-Hydroxyectoin zeigt der Promotor vor *uehA* ( $P_{uehA}$ -*lacZ* auf pBAS21) ebenfalls nur eine Basalaktivität. Die Expression ausgehend von diesem Promotor steigt jedoch deutlich an, wenn die Substrate Ectoin (um den Faktor 27) oder 5-Hydroxyectoin (um den Faktor 56) im Medium vorhanden sind. Hierbei fällt auf, dass die Promotoraktivität bei einer Kultivierung der Zellen auf 5-Hydroxyectoin mit  $1350 \pm 23$  MU mehr als doppelt so hoch ist, wie der Vergleichswert für ein Wachstum auf Ectoin ( $625 \pm 5$  MU) (Abb. 15; Tab. A1). Noch deutlicher erhöht, wird die Transkription unter induzierenden Bedingungen, wenn beide Promotoren und das vollständige *enuR*-Gen auf

dem Fusionsplasmid vorhanden sind ( $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$  auf pBAS20). Die Promotoraktivität erhöht sich dabei um das 30-fache im Vergleich zu der Glucose-Kontrolle, wenn Ectoin als Substrat vorhanden ist. Die Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin führt zu einer 78-fach stärkeren Expression im Vergleich zur Glucose-Kontrolle. Wie bereits in den Dot Blot-Analysen (Abb. 11) gezeigt, erfolgt die Expression von *uehA* und vermutlich aller nachfolgenden Gene (*uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*) von einem Promotor der entweder in der 5'-Region des *enuR*-Gens oder in der intergenen Region von *enuR* und *uehA* gelegen ist (Abb. 14). Dieser Promotor erfährt eine deutliche Substratinduktion, wenn Ectoin im Medium vorhanden ist und steigt in Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin weiter an (Abb. 15; Tab. A1). Die volle Induktion wird jedoch erst erreicht, wenn ein sehr großer Bereich vor dem Startcodon des *uehA*-Gens (> 405 bp) vorhanden ist, da das Expressionssignal der  $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion deutlich unter dem der  $P_{enuR}$ - $enuR$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion liegt (Abb. 15; Tab. A1).



**Abbildung 15: Expressionsmuster der drei Reportergenfusionen in *R. pomeroyi* J470**

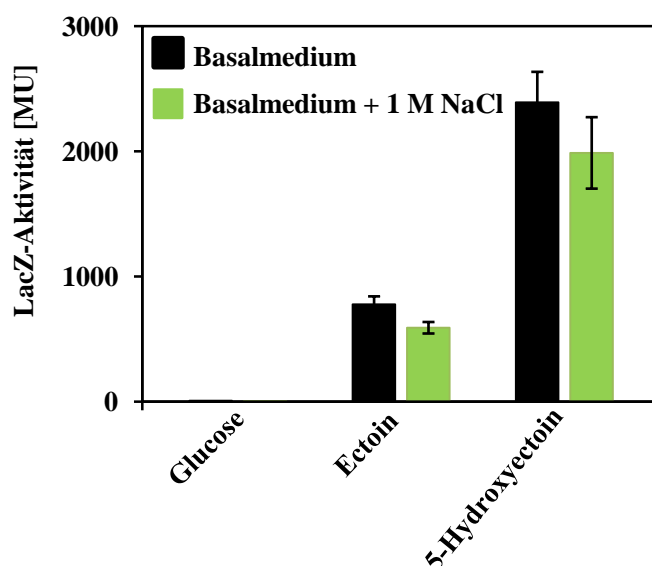
Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $lacZ$ -Fusion, der  $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion und der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion in *R. pomeroyi* J470. Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Schwarz), Ectoin (grün) oder 5-Hydroxyectoin (rot) bei 30°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

#### 4.4.2 Die Abhängigkeit der Expression von $P_{uehA}$ von weiteren Faktoren

In Abschnitt 4.1 wurde bereits gezeigt, dass 5-Hydroxyectoin und Ectoin von *R. pomeroyi* DSS-3 nicht als osmotische Schutzsubstanzen aufgenommen werden können. Ob der Ectoin-induzierbare Promotor vor *uehA* dennoch von einer erhöhten NaCl-Konzentration im Medium beeinflusst wird, wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls

getestet. Dazu wurde *R. pomeroyi* DSS-3 mit der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion in Basalmedium mit den standartmäßig verwendeten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie 0,5 M NaCl kultiviert. Die Proben wurden, wie zuvor beschrieben, geerntet und im LacZ-Assay eingesetzt.

Wie zuvor für Abbildung 14 beschrieben, zeigt der *uehA*-Promotor keine Induktion in der Abwesenheit von Ectoinen. Die Expression steigt jedoch bei Zusatz von Ectoin ( $776 \pm 75$  MU) und 5-Hydroxyectoin ( $2391 \pm 243$  MU) stark an. Für keine der untersuchten Bedingungen ist ein signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität zu verzeichnen, wenn das Medium zusätzlich 0,5 M NaCl enthält (Abb. 16; Tab. A1). Die Expression des *uehA*-Promotors ist daher nicht Salz-abhängig.



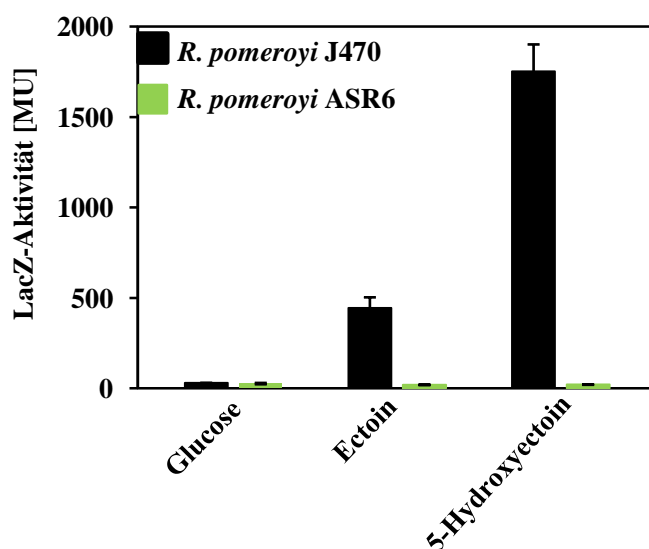
**Abbildung 16: Der Einfluss von hohen Salinitäten auf  $P_{uehA}$  in *R. pomeroyi* J470**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion in *R. pomeroyi* J470 ohne (schwarz) und mit (grün) 0,5 M NaCl im Wachstumsmedium. Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$ , Ectoin oder 5-Hydroxyectoin bei 30°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

Um die Abhängigkeit der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  von der Anwesenheit des *enuR*-*uehABC*-*usp*-*eutABCDE*-*asnC*-*ssd*-*atf*-Operons zu untersuchen, wurde die beschriebene *lacZ*-Fusion ebenfalls in *R. pomeroyi* ASR6 [ $\Delta(enuR$ -*uehABC*-*usp*-*eutABCDE*-*asnC*-*ssd*-*atf*::*Gm*)1] konjugiert und für ein LacZ-Assay verwendet. Wie in Abbildung 11 A dargestellt, zeigt die  $\Delta(enuR$ -*uehABC*-*usp*-*eutABCDE*-*asnC*-*ssd*-*atf*::*Gm*)1-Mutante kein Wachstum mehr auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Eine äußerst

schwache Katabolitrepression des hier untersuchten Stoffwechselweges durch Glucose (Abb. A2) erlaubt, dass dennoch eine Durchführung von LacZ-Assays in dieser Mutante möglich ist. Dabei sinkt die Expression ausgehend von  $P_{uehA}$  auf etwa 60%, wenn Ectoin und Glucose gleichzeitig im Medium vorliegt und auf etwa 75%, wenn 5-Hydroxyectoin gemeinsam mit Glucose im Medium vorhanden ist. Diese Beobachtung konnte zuvor auch für *C. salexigens* beschrieben werden (274). Für dieses und alle folgenden Experimente in denen Mutanten verwendet wurden, die kein Wachstum mehr auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin zeigten, wurden die entsprechenden Bakterienkulturen in Basalmedium mit 28 mM Glucose, 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 28 mM Ectoin oder 5-Hydroxyectoin kultiviert und das LacZ-Assay entsprechend dem beschriebenen Verfahren durchgeführt.

In Abwesenheit des gesamten Operons sinkt die Expression ausgehend von dem Promotor vor *uehA* in allen getesteten Bedingungen auf ein Minimum von  $25 \pm 3$  MU und entspricht damit der Induktion die auch während des Wachstums auf Glucose zu beobachten war. Die Induktion und mögliche Aktivierung der Expression des  $P_{uehA}$  ist daher entweder von dem UehABC-abhängigen Transport der Ectoine in die Zelle oder deren Degradation durch EutABCDE-Atf-Ssd abhängig.



**Abbildung 17: Expressionsmuster der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Reportergernefusion in *R. pomeroyi* ASR6 [ $\Delta(enuR$ -uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1]**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und *R. pomeroyi* ASR6 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden, wenn nötig, in einer Konzentration von 28 mM zugesetzt. Die Mittelwerte und

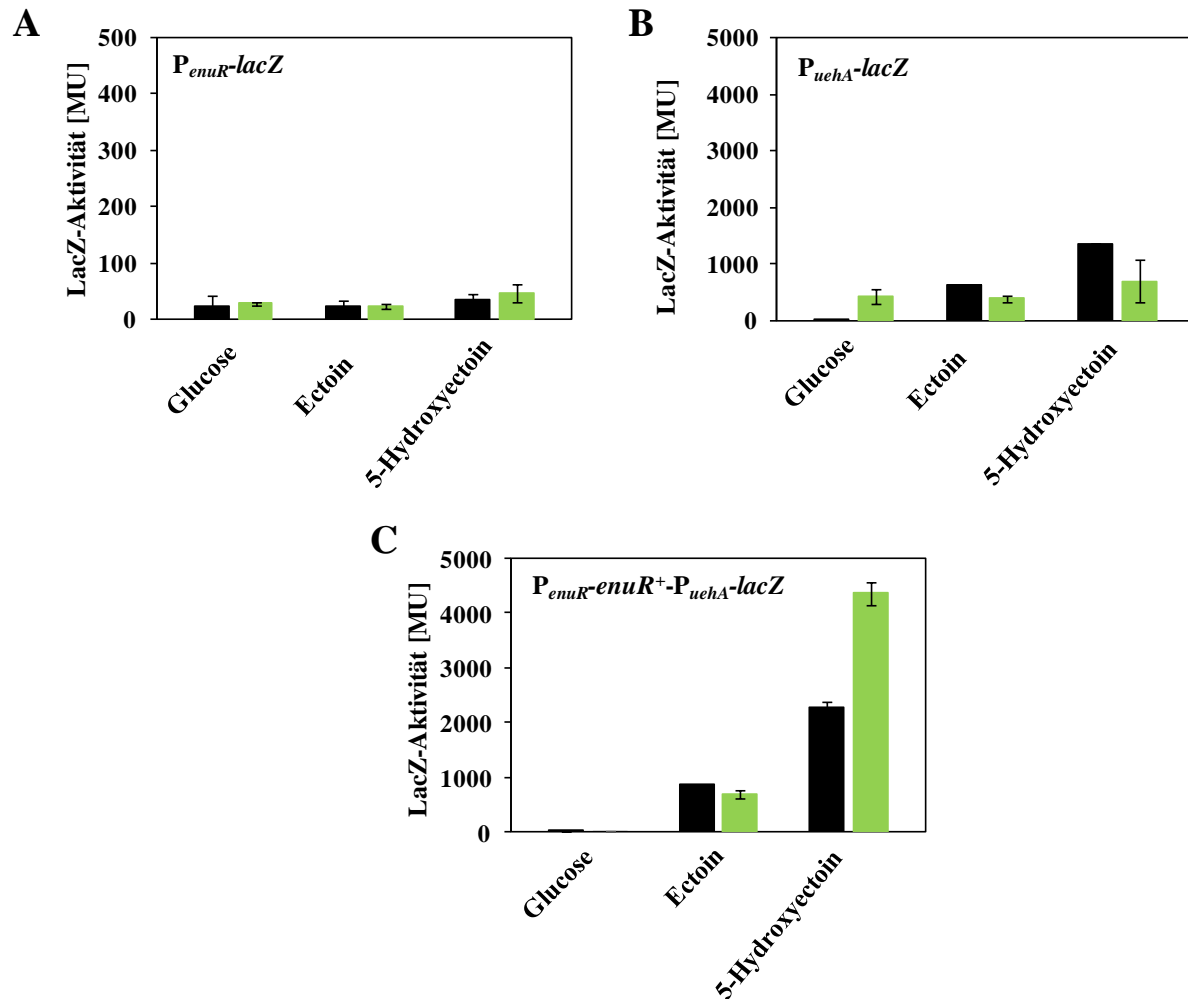


Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

#### 4.4.3 EnuR wirkt als Repressor und Aktivator auf $P_{uehA}$

Da das gesamte Gencluster ausgehend von dem *enuR*-Promotor co-transkribiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass EnuR eine besondere Rolle in der Regulation der Genexpression dieses Operons einnimmt. Andere bekannte MocR/GabR-Typ Regulatoren (126,228) sind sowohl als Aktivatoren als auch als Autorepressoren beschrieben (224,226,227). Um die Wirkung von EnuR auf die beiden beschriebenen Promotoren zu untersuchen, wurden die in Abb. 14 dargestellten *lacZ*-Fusionsplasmide in den Stamm ASR7 [ $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$ ] konjugiert und unter den oben beschriebenen Bedingungen in einem LacZ-Assay eingesetzt.

Wie auch im *R. pomeroyi* Wildtyp erfolgt die Expression des *lacZ*-Gens von der  $P_{enuR}$ -*lacZ*-Fusion (auf pBAS19) konstitutiv und auf einem sehr niedrigen Level (Abb. 18 A). Das Expressionssignal liegt bei  $31 \pm 11$  MU und hat daher keine signifikante Abweichung zur Expression des Promotors im Wildtyp-Hintergrund. EnuR beeinflusst die Expression des Promotors vor seinem eigenen Strukturgen nicht. Der Verlust des *enuR*-Gens resultiert jedoch in der konstitutiven Expression des *uehA*-Promotors, wie aus Abb. 18 B hervorgeht. Der Promotor ist im  $\Delta(enuR_{1-975})$ -Hintergrund unabhängig von der Anwesenheit des Substrats aktiv. In diesem Zusammenhang muss angemerkt werden, dass die Expressionssignale nicht mehr die gleiche Intensität erreichen wie zuvor im Wildtyp-Hintergrund. Wie sowohl aus Abbildung 17 C als auch der tabellarischen Auswertung der Messwerte in Tabelle A1 zu entnehmen ist, ist die Intensität der Signale um etwa die Hälfte reduziert. Wie bereits in Folge der Wachstumsexperimente vermutet wurde (Abb. 12 C), wirkt EnuR als Repressor auf die Transkription des *enuR-uehABC-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons. Die Operatorsequenz liegt im Promotor, der entweder in der 5'-Region des *enuR*-Gens oder in der intergenen Region von *enuR* und *uehA* liegen muss (Abb. 14). Die Konjugation der  $P_{enuR^+enuR^+}P_{uehA}$ -*lacZ*-Fusion (auf pBAS20) in den ASR7  $\Delta(enuR_{1-975})$ -Hintergrund bewirkt, die Komplementation der chromosomalen Deletion des Regulatorgens. Unter induzierenden Bedingungen wird *enuR* vom Plasmid exprimiert. Es handelt sich somit wieder um einen *enuR*<sup>+</sup>-Stamm. Im LacZ-Assay ist daher ein Wildtyp-ähnliches Expressionsmuster zu beobachten (Abb. 18 C). Interessanterweise steigt die Expression bei 5-Hydroxyectoin-Anwesenheit auf etwa das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp.



**Abbildung 18: Expressionsmuster verschiedener Reportergenfusionen in *R. pomeroyi* J470 und *R. pomeroyi* ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$**

Gezeigt ist die Promotoraktivität (A) der  $P_{enuR}$ -lacZ-Fusion, (B) der  $P_{uehA}$ -lacZ-Fusion und (C) der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ -lacZ-Fusion in *R. pomeroyi* ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$  (grün) im Vergleich zum Wildtyp *R. pomeroyi* J470 (schwarz). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$ , Ectoin oder 5-Hydroxyectoin bei 30°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

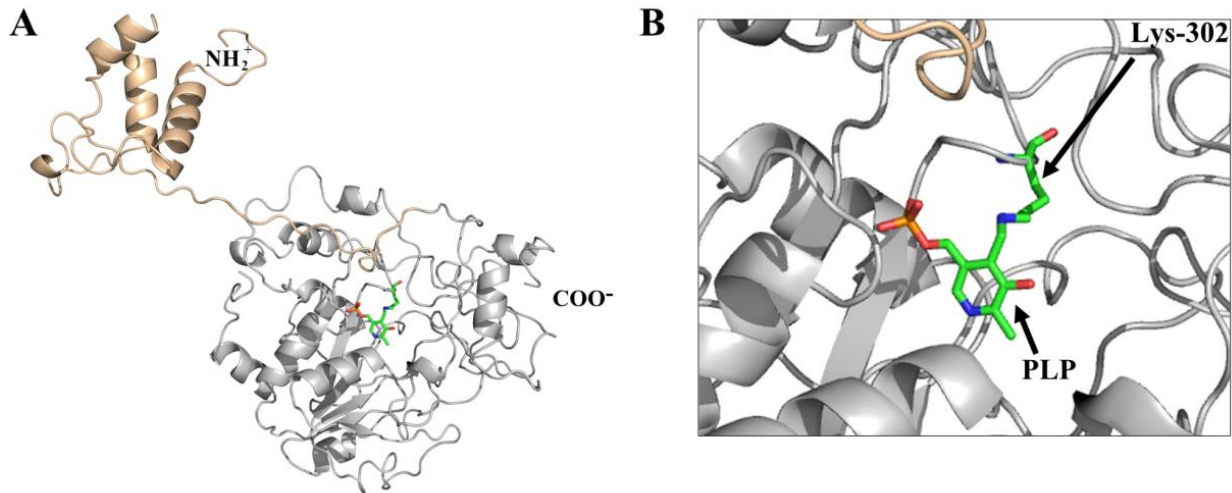
In allen folgenden Experimenten blieb das konstitutive niedrige Expressionsniveau des *enuR*-Promotors (auf Plasmid pBAS19) unverändert, daher wird auf dessen Darstellung und Erläuterung im Folgenden verzichtet. Die Messergebnisse der  $P_{uehA}$ -lacZ-Fusion (pBAS21) glichen in ihrer Aussagefähigkeit stets denen der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ -lacZ-Fusion (pBAS20). Sie waren jedoch in ihren absoluten Werten unter denen der langen Fusion auf pBAS20 angesiedelt. Daher wird auch auf die Darstellung der Ergebnisse der  $P_{uehA}$ -lacZ-Fusion-Messungen, wenn angemessen, verzichtet.

## 4.5 Biochemische Charakterisierung des EnuR-Transkriptionsfaktors

Das erste Gen des identifizierten Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Abbaucusters in *R. pomeroyi* DSS-3, kodiert für einen Transkriptionsregulator der GntR-Superfamilie. Dessen wichtige Rolle als Transkriptionsregulator in *R. pomeroyi* DSS-3 wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt (Abb. 18 B). Innerhalb der GntR-Superfamilie gehört EnuR zur Subfamilie der MocR/GabR-ähnlichen Proteine (126,228). Es handelt sich um chimäre Proteine, deren aminoterminaler (N-terminal) Bereich eine winged-helix-turn-helix Struktur ausbildet. Diese ist durch die MocR-Subfamilie hinweg in ihrer Struktur, nicht aber ihrer Sequenz (126) (Abb. A9), hochkonserviert und dient der DNA-Bindung. Gefolgt wird diese von einem langen Linker und einer carboxyterminalen (C-terminal) Domäne, welche sich besonders durch seine Größe (etwa 350 Aminosäuren) und seine Homologie zu Aminotransferasen des Typ I auszeichnet (126,219,222) (Abb. A9).

### 4.5.1 *In silico* Analyse der tertiären Struktur von EnuR

Das EnuR-Protein aus *R. pomeroyi* DSS-3 besteht aus 464 Aminosäuren. Homologiemodellstudien mit Hilfe des Swiss-Model Servers (275–277) errechneten die Kristallstruktur von GabR (PDB accession code 4N0B) aus *Bacillus subtilis* (229) als strukturell am ehesten verwandt und ermöglichten die Erstellung eines *in silico* Modells des regulatorischen Proteins (Abb. 19 A). Diesem Modell ist zu entnehmen, dass EnuR aus einem N-terminalen helix-turn-helix Motiv (Aminosäuren 1-75), gefolgt von einem 25 Aminosäure-langem Linker und einer C-terminalen Domäne (Aminosäuren 100-464) besteht. Der C-terminale Bereich weist in seiner tertiären Struktur Homologien zu den Aminotransferasen des Typ I auf (Abb. 19 A und A9). EnuR gehört daher ebenfalls zur MocR/GabR-Subfamilie der GntR-Superfamilie (126,228).



**Abbildung 19: *in silico* Model von EnuR**

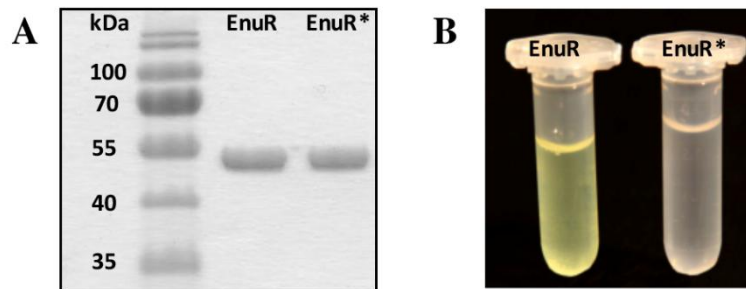
Die Kristallstruktur des *Bacillus subtilis* GabR-Proteins in Komplex mit seinem Cofaktor PLP (protein database accession code 4N0B) (229) wurde als Grundlage für das *in silico* Model des Transkriptionsregulators EnuR ausgewählt. Für die bildliche Bearbeitung der auf dem Swiss Model berechneten Modelle wurde PyMol suit (<https://www.pymol.org/>) genutzt. (A) Das helix-turn-helix DNA-Bindemotiv des EnuR-Models ist in gold dargestellt. Die C-terminale Typ I Aminotransferase-Domäne wird in grau gezeigt. (B) Der PLP-Cofaktor ist kovalent an Lysin-302 des EnuR aus *R. pomeroyi* DSS-3 gebunden und wurde mit Hilfe einer Überlagerung des Models und der GabR-Kristallstruktur in die Cofaktor-Bindetasche modelliert.

#### 4.5.2 EnuR bindet Pyridoxal-5'-Phosphat

Das charakteristischste Merkmal der Aminotransferasen des Typ I ist ihr Cofaktor, welcher als Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), ein Vitamin B6-Derivat, bezeichnet wird (278,279). Für die Koordination von PLP im aktiven Zentrum des Enzyms ist unter anderem ein konservierter Lysin-Rest von Bedeutung, der über die primären  $\epsilon$ -Aminogruppe die kovalente Bindung des Cofaktors über eine Schiff'sche Base ermöglicht (221,280). Durch den Homologievergleich mit GabR (227) ist zu erwarten, dass es sich bei diesem Lysin in EnuR um Lysin-302 handelt (Abb. 19 B).

Um dies zu untersuchen wurde das *enuR*-Gen für *E. coli* codonoptimiert (Life Technologies, Darmstadt, Germany) und das EnuR-Protein C-terminalen mit einem *Strep*-Tag II fusioniert. Dieses Fusionspeptid wurde heterolog in *E. coli* BL21 überproduziert und anschließend mittels *Strep*-Tag II-Affinitätschromatografie aus dem Zelllysat aufgereinigt (Abb. 20 A). Die reine Proteinlösung wies eine gelbe Farbe auf (Abb. 20 B), die auf die Anwesenheit des Chromophors PLP hinweist (281). Um dies zu bestätigen, wurde eine EnuR-Mutante (EnuR\*) konstruiert, in der Lysin-302 mittels gerichteter Mutagenese gegen einen Histidin ausgetauscht wurde. EnuR\* sollte nicht mehr in der Lage sein, PLP kovalent zu binden, da der Histidinrest keine primäre Aminogruppe besitzt, die zu der Ausbildung

einer Schiff'schen Base führen könnte. Die Überproduktion und Reinigung von EnuR\* über Strep-Tag II-Affinitätschromatografie führte zu einer klaren Proteinlösung (Abb. 20 A und B). Die Bindung des im Wildtypprotein gebundenen Chromophors ist daher durch die gezielte Mutation des Lysin-302 nicht mehr möglich.



**Abbildung 20: Rekombinante Überproduktion von EnuR und der Lys-302/His-Mutante (EnuR\*)**

(A) EnuR und EnuR\* wurden in *E. coli* überproduziert und mittels Strep-Tag II-Affinitätschromatografie aufgereinigt. 10 µg jedes Proteins wurden auf ein 12 % SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Schwerte, Germany) wurde als Marker verwendet. (B) Lösungen ( $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) des aufgereinigten EnuR-Proteins (gelb) und EnuR\* (farblos).

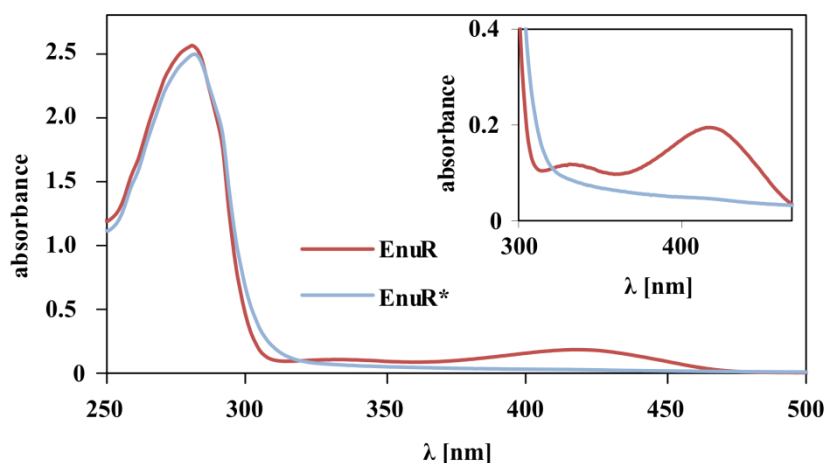
#### 4.5.3 Identifizierung des PLP-Cofaktors

Für den Nachweis, dass es sich bei dem mit EnuR assoziierten Chromophor tatsächlich um PLP handelt, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

##### 4.5.3.1 Identifizierung des Cofaktors mittels UV/Vis-Spektroskopie

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie kann die Schiff'sche Base (internes Aldimin), die sich zwischen der primären Aminogruppe des Lysins-302 und der Aldehydgruppe des PLP ausbildet, indirekt visualisiert werden. Proteine, die ein kovalent gebundenes PLP enthalten, weisen charakteristische Absorptionsbanden bei 330 nm und 420 nm auf (282). In einem UV/Vis-Scan von 20 µM EnuR, in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 und 500 nm, sind drei eindeutige Absorptionsbanden zu erkennen. Die erste Bande bei 280 nm entspricht dem Absorptionsmaximum des Proteins selbst. Bei 330 nm und 420 nm sind die charakteristischen Absorptionsbanden des kovalent gebundenen PLP zu erkennen (Abb. 21). Die Aufnahme des Spektrums von EnuR\* im gleichen Spektralbereich zeigt ebenfalls eine Absorptionsbande bei 280 nm mit der gleichen Absorptionsintensität, wie sie zuvor für EnuR aufgenommen wurde. Da für die Messungen gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden können Unterschiede im Spektrum nicht auf eine reduzierte Proteinmenge

im Assay zurückgeführt werden. Die Absorptionsmaxima bei 330 nm und 420 nm sind nicht mehr vorhanden (Abb. 21). EnuR\* hat die Fähigkeit verloren, das zuvor identifizierte PLP in seiner Ligandenbindetasche zu koordinieren.



**Abbildung 21: UV/Vis-Spektren von EnuR und der Lys-302/His Mutante (EnuR\*)**

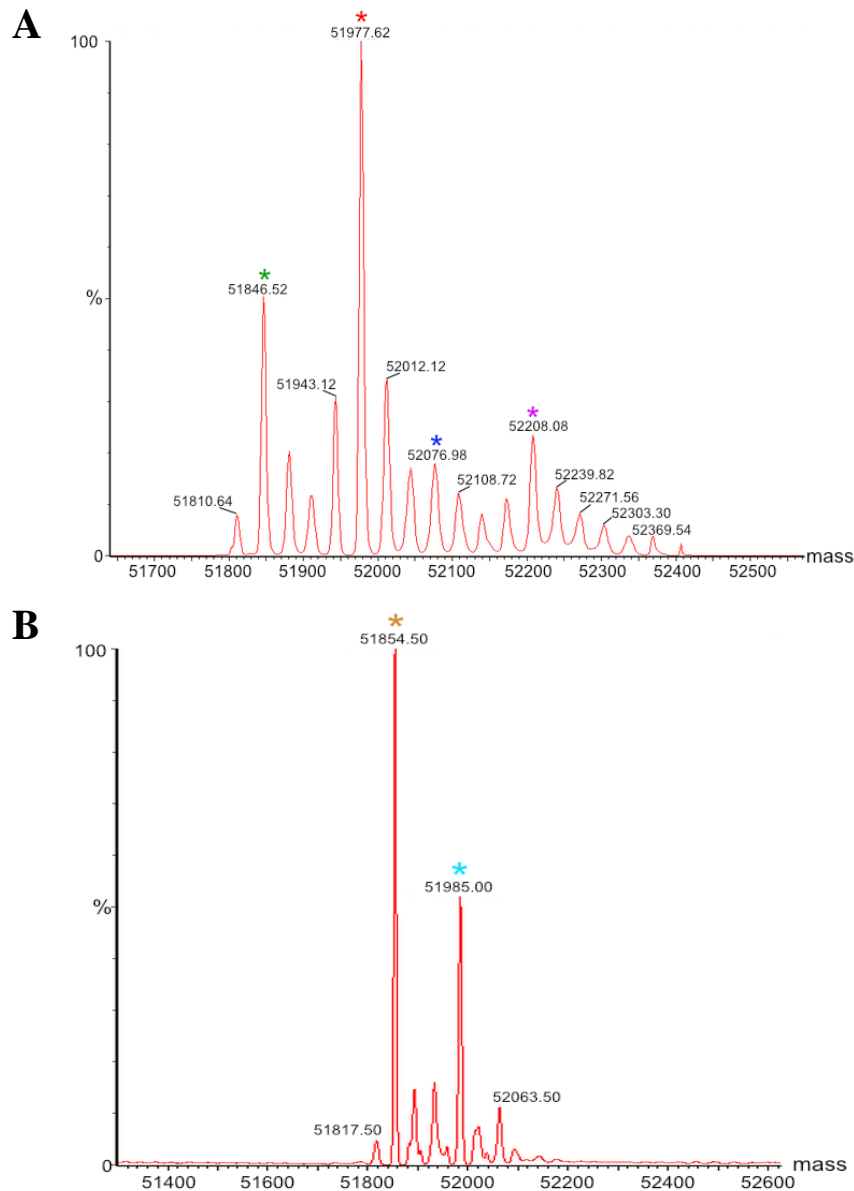
Das rekombinante EnuR-*Strep*-tag II (rot) und EnuR\*-*Strep*-tag II (blau) wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und von einer 20  $\mu$ M Lösung bei 21°C im Reinigungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) ein Absorptionsspektrum zwischen 250 und 500 nm aufgenommen. Die charakteristischen Absorptionsmaxima eines kovalent-gebundenen PLP-Cofaktors liegen bei 330 und 420 nm und treten im Spektrum von EnuR\* nicht auf. EnuR\* kann kein PLP binden.

#### 4.5.3.2 Identifizierung des Cofaktors mittels Massenspektrometrie

Der direkte Nachweis der kovalente Bindung des PLPs an das Wildtyp-EnuR wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie erbracht. Dazu wurde die Masse beider Proteine unter denaturierenden Bedingungen, mit und ohne Zusatz von Natriumborhydrid bestimmt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen, das heißt ohne Zusatz von Borhydrid, lassen sich sowohl für EnuR als auch für EnuR\* die Masse des gesamten Peptids (51.978 Da für EnuR und 51.985 Da für EnuR\*) bestimmen (Abb. A3 A und B). Diese Massen liegen in sehr guter Näherung zu den errechneten Peptidmassen von EnuR-*Strep* (51.977 Da) und EnuR\*-*Strep* (51.986 Da). Das verwendete Massenspektrometer hat im Allgemeinen eine Massengenauigkeit von  $\pm 1$  Da. Zusätzlich sind eindeutige Peaks der Peptidmassen nach Abspaltung des Startmethionins erkennbar (51.846 Da für EnuR und 51.855 Da für EnuR\*). Dies ist häufig der Fall für Proteine, die heterolog in *E. coli* überproduziert wurden und macht eine Massendifferenz von 131 Da zum vollständigen Peptid aus (Abb. A3 A und B). Das PLP unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Wildtyp-EnuR nicht nachgewiesen werden kann, liegt an der Labilität der Aldiminbindung gegenüber den sauren Bedingungen der LCMS-Analyse. Um die Bindung zwischen EnuR und seinem Co-Faktor dennoch für die

verwendete Messmethode zugänglich zu machen, muss die labile Doppelbindung des Imins zwischen PLP und Lysin-302 stabilisiert werden. Dies geschieht durch Zugabe von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Natriumborhydrid zu der Proteinlösung. Aus der labilen Aldiminbindung wird durch die Anlagerung zweier Protonen eine stabilere monovalente Aminbindung. PLP hat eine molekulare Masse von 247 Da. Durch die Bildung der Schiff'schen Base zwischen Lysin-302 und der Aldehydgruppe des PLP wird ein Wassermolekül abgespalten ( $- 18 \text{ Da}$ ) und durch die Reduktion der Imin-Bindung mit Borhydrid werden zwei Wasserstoffionen inkorporiert ( $+ 2 \text{ Da}$ ). Daher ergibt sich für den reduzierten EnuR-PLP-Komplex eine Massendifferenz von 231 Da gegenüber dem EnuR-Peptid ohne PLP. Die massenspektrometrische Vermessung der reduzierten Probe resultierte in dem in Abb. 22 A gezeigten Massenspektrum. Zusätzlich zu dem PLP-freien EnuR-Peak (roter Stern) und dem Massenpeak für EnuR ohne Startmethionin (grüner Stern) sind hier, im Vergleich zu dem Spektrum der nicht-reduzierten Proben (Abb. A3 A), weitere Peaks erkennbar. Der lila markierte Massenpeak (52.208 Da) (Abb. 22 A) entspricht EnuR mit gebundenem PLP. Der blau markierte Massenpeak (52.076 Da) entspricht der Masse des EnuR-Peptids mit PLP aber ohne dem Startmethionin. Die geringe Ausprägung der Peaks liegt wahrscheinlich an der Instabilität von EnuR bei Raumtemperatur und der unvollständigen Reduktion des PLP unter den gegebenen Reduktionsbedingungen (2 h bei Raumtemperatur), so dass ein großer Teil des PLP während der Messung in der LCMS verloren ging. Die hohe Massengenauigkeit dieses spektrometrischen Verfahrens lässt dennoch eine eindeutige Interpretation der vorliegenden Daten zu.

Das gleiche Verfahren wurde auf die Lys-302/His-Mutante des EnuR angewandt. In der Analyse des EnuR\* nach Behandlung mit Borhydrid entstehen im Massenspektrum (Abb. 22 B) keine zusätzlichen Peaks im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abb. A3 B). Die Lys-302/His-Mutante ist nicht mehr in der Lage, PLP in seinem aktiven Zentrum zu koordinieren.



**Abbildung 22: MS-Spektren von EnuR und EnuR\***

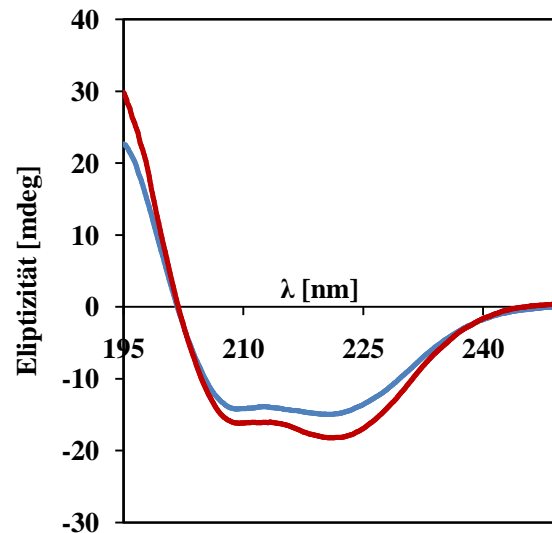
Die rekombinanten EnuR-*Strep*-tag II (A) und EnuR\*-*Strep*-tag II (B) wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und mit  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Borhydrid behandelt. Die Proben wurden mittels HPLC entsalzt und über ein Synapt G2Si mass spectrometer analysiert. Detektiert wurden positive Ionen innerhalb eines Massenbereichs von 500-5000 m/z. (A) Der PLP-freien EnuR-Peak ist mit einem roten Stern gekennzeichnet, der Massenpeak für EnuR ohne Startmethionin mit einem grünen Stern. Ein blauer Stern markiert den Massenpeak von des EnuR mit gebundenem Cofaktor und ein grüner Stern den selbigen, aber ohne Startmethionin. (B) Der PLP-freien EnuR-Peak ist mit einem hell blauen Stern gekennzeichnet, der Massenpeak für EnuR ohne Startmethionin mit einem orangefarbenen Stern.



Zusammenfassend wird deutlich, dass sowohl im UV/Vis-Spektrum, als auch durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden konnte, dass der Cofaktor PLP in der Effektorbindedomäne des Transkriptionsfaktors EnuR koordiniert wird und dass dieser kovalent an Lysin-302 gebunden ist. Der Austausch von Lysin-302 gegen Histidin in der Mutante EnuR\* verhindert die Cofaktorbinding.

#### 4.5.4 Die sekundär Struktur von EnuR und EnuR\*

Der Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen eines Proteins lässt sich über die Circular dichroismus-Spektropolarimetrie bestimmen. Die optische Aktivität von Proteinen beruht auf der Absorption von polarem Licht am L-konfigurierten  $\alpha$ -C-Atom. Dieser Effekt entfällt für Glycin, da dieses kein chirales Zentrum aufweist. Threonin und Isoleucin haben dagegen noch ein zweites asymmetrisches Zentrum. Auch die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten eines Proteins tragen zur optischen Aktivität bei. CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170 - 250 nm) werden verwendet, um den Anteil der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente im Protein zu bestimmen.  $\alpha$ -Helices zeigen ausgeprägt Minima bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 190 nm.  $\beta$ -Faltblätter dagegen sind durch eine negative Bande bei 215 nm und einer positiven Bande bei 198 nm gekennzeichnet. Das Absorptionsspektrum unstrukturierter Peptide zeigen ein schwaches Absorptionsminimum bei 195 nm und verläuft ansonsten gegen null (283). Um sicherstellen zu können, dass die Einführung der Lysin-302/Histidin-Mutation in EnuR und dem damit verbundene Verlust der Gelbfärbung der Proteinlösung nicht auf einem generell negativen Effekt auf die Proteinfaltung beruht, wurden sowohl die Proteinlösung des Wildtyp EnuRs als auch die seiner Mutante EnuR\* mittels Circular dichroismus-Spektropolarimetrie analysiert. Für die Messung der Ausprägung der Sekundärstrukturelemente wurden die Absorptionsspektren von jeweils 3,5  $\mu$ M EnuR und EnuR\* im fernen UV-Bereich zwischen 195 und 250 nm aufgenommen. Beide Proteine zeigen einen stark ausgeprägten negativen Doppelpeak bei 208 und 222 nm, wobei die Bande bei 208 nm weniger negativ ist als die Bande bei 222 nm (Abb. 23). Dies ist der Fall, da die sekundäre Struktur von EnuR und seinem Derivat hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices ausgebildet wird, aber einen Anteil  $\beta$ -Faltblätter enthält. Der stark negative Wert der Eliptizität im Falle der  $\alpha$ -Helices wird also durch den weniger negativen Wert der  $\beta$ -Faltblätter an dieser Stelle ausgeglichen und verschiebt diesen Abschnitt der Kurve daher weiter gegen null. Diese Beobachtung befindet sich im Einklang mit dem errechneten Modell aus Abbildung 18, welches ebenfalls hauptsächlich aus  $\alpha$ -helicalen Strukturen besteht und nur wenige  $\beta$ -Faltblätter ausweist. Beide Proteine zeigen den gleichen Verlauf des CD-Spektrums. Die eingeführte Mutation führte zwar zum Verlust des PLP-Cofaktors, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur des Peptids.



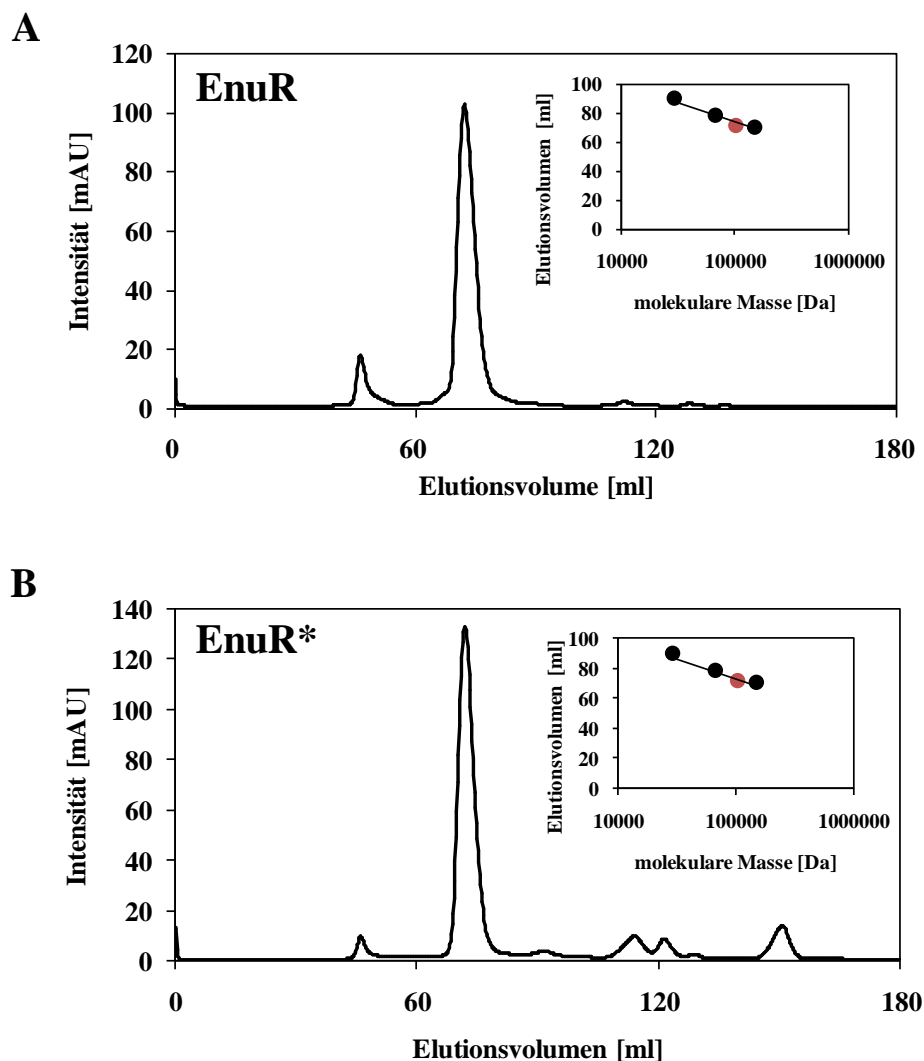
**Abbildung 23: Die sekundäre Struktur von EnuR und der Lys-302/His Mutante (EnuR\*)**

Das rekombinant EnuR-Strep-tag II (rot) and EnuR\*-Strep-tag II (blau) wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und von einer 3,5  $\mu$ M Lösung im Thermophoresepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween) ein CD-Spektrum zwischen 195 und 255 nm aufgenommen.

#### 4.5.5 Die quaternäre Struktur von EnuR und EnuR\*

Um die quaternäre Struktur des EnuR-Regulators in Lösung zu bestimmen, wurde das gereinigte Protein (Abb. 20 A) der Größenausschlusschromatografie unterzogen. Mit Hilfe des ProtParam Werkzeugs des Expasy-Servers (284) konnte für ein EnuR-Strep-tag II-Monomer eine Masse von 51,977 kDa bestimmt werden. Entsprechend der Größenstandards errechnete sich nach dem Lauf der Gelfiltrationssäule eine Masse von 102,73 kDa für das Fusionsprotein (Abb. 24 A). EnuR-Strep bildet daher ein Homodimer in Lösung. Des Weiteren zeigte sich in dem Chromatogram, dass die untersuchte Proteinlösung größten Teils frei von Proteinaggregaten ist (Abb. 24 A).

Um den Einfluss des PLP-Cofaktors auf die Oligomerisierung des Proteins zu untersuchen, wurde das EnuR\*-Strep-Fusionsprotein ebenfalls mittels Größenausschlusschromatografie analysiert. Für EnuR\*-Strep wurde eine monomere Masse von 51,985 kDa berechnet. Aus dem Lauf über die Gelfiltrationssäule errechnete sich eine Masse von 103,9 kDa. EnuR\* bildet ebenfalls Homodimere in Lösung (Abb. 24 B).



**Abbildung 24: Die quaternäre Struktur des EnuR-Strep-tag II-Proteins und der Lys302/His Mutante (EnuR\*-Strep-tag II)**

Die rekombinanten Proteine EnuR-Strep-tag II (A) and EnuR\*-Strep-tag II (B) wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und durch Größenausschlusschromatografie analysiert. Im eingebetteten Diagramm wird das chromatographische Verhalten des EnuR-Strep-tag II- and EnuR\*-Strep-tag II-Proteins (etwa 103 kDa) (rote Punkte) relativ zu dem der Markerproteine, Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (29 kDa), Albumin aus Rinderserum (66 kDa) und Alkoholdehydrogenase aus Hefe (150 kDa) dargestellt (schwarze Punkte).

#### 4.5.6 Analysen zur Ligandenbindung durch EnuR

Die Regulation kataboler Stoffwechselwege hängt oftmals von der Anwesenheit des Substrats im Medium und allosterischen Effekten ab (285). Dass die Transkription des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons an die Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin oder Ectoin im Wachstumsmedium gekoppelt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden (Abb. 15). Auch die kovalente Bindung des Cofaktors PLP in der Ligandenbindetasche des Transkriptionsfaktors EnuR wurde hier bereits analysiert (Abb. 21

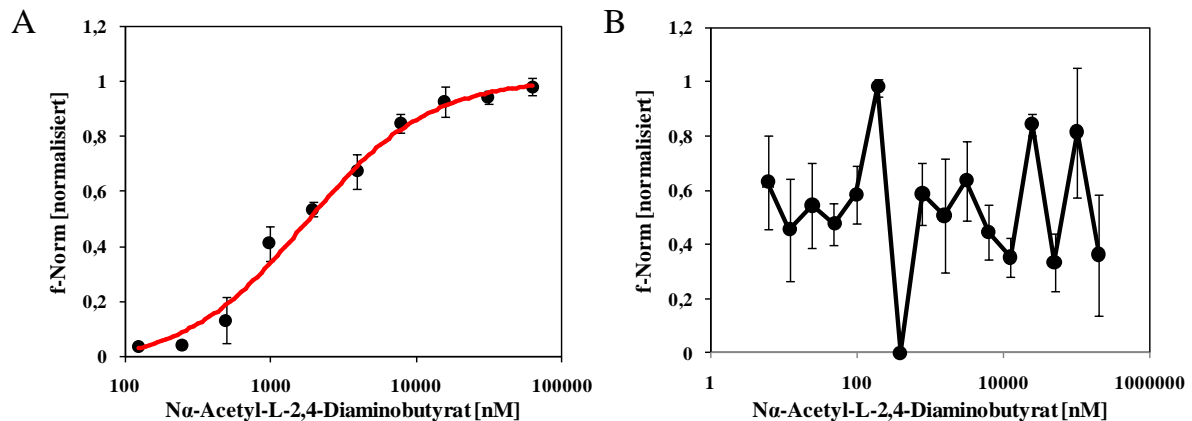
und Abb. 22). Der gleiche Cofaktor liegt in dem homologen Protein GabR aus *B. subtilis* (228) vor, welches den Katabolismus von  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) reguliert. Für diesen Transkriptionsaktivator wurde bereits gezeigt, dass bei Anwesenheit des Induktors  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) die Schiff'sche Base (internes Aldimin) zwischen GabR und PLP gelöst und stattdessen eine Schiff'sche Base (externes Aldimin) zwischen PLP und GABA gebildet wird (229,230). Wie in allen PLP-abhängigen Reaktionen ist die Voraussetzung für diese Reaktion die Anwesenheit einer primären Aminogruppe im Ligandenmolekül (286,287).

Für die Bestimmung des Induktors von EnuR wurde sich der 'microscale thermophoresis' (MST) (NanoTemper Technologies GmbH, Germany) bedient. Hierbei handelt es sich um eine neue Methode zur Analyse von Biomolekülen. MST ist als die gerichtete Bewegung von Molekülen in einem mikroskopisch kleinen Temperaturgradienten definiert. Dies erlaubt eine sensitive Detektion von Interaktionen zwischen Biomolekülen (288,289). Jede Veränderung in Größe, Konformation, Ladung oder in der Hydrathülle resultieren in einer veränderten Bewegung von Molekülen entlang des Temperaturgradienten und kann daher genutzt werden, um zum Beispiel Bindungsaffinitäten zu bestimmen (290)

Die beschriebenen *in vitro* Affinitätsstudien wurden für Ectoin, 5-Hydroxyectoin, sowie den putativen Produkten der EutD-Enzymreaktion N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat und N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat (Abb. 3) vorgenommen. Für dieses Experiment wurden 200 nM des Fluoreszenz-markierten EnuR-*Strep*-Fusionsproteins mit Ligandenkonzentrationen zwischen 200  $\mu$ M und 3,6 nM versetzt und mittels MST vermessen. Das markierte Protein wird durch den nicht-markierten Liganden titriert. Mit Hilfe von polarisiertem Licht wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Das ligandenfreie Protein diffundiert im Temperaturgradienten schneller, wodurch weniger emittierte Fluoreszenz gemessen wird. Der Komplex aus Ligand und Protein diffundiert langsamer entlang des Temperaturgradienten, wodurch mehr der emittierten Fluoreszenz detektiert werden kann. Mittels des Massenwirkungsgesetzes wird die  $K_d$  der Ligandenbindung aus den Unterschieden in emittierter Fluoreszenz bestimmt (288,289).

Das thermophoretische Verhalten von EnuR wurde mit steigender Konzentration von N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat zunehmend verändert, was auf eine binäre Wechselwirkung schließen lässt. Es konnte eine sigmoide Bindungskurve aufgenommen und eine Bindungskonstante von 1,73 (+/- 0,73)  $\mu$ M berechnet werden (Abb. 25 A). Diese Interaktion ist spezifisch, da unter gleichen experimentellen Bedingungen keine Bindung zwischen EnuR und N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat, Ectoin oder 5-Hydroxyectoin ermittelt werden konnte (Abb. A4).

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde ebenfalls die Bindungsaffinität von Na-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat zu EnuR\* gemessen. Das EnuR-Derivat kann den Cofaktor PLP nicht mehr in seiner Ligandenbindetasche koordinieren. In diesem Fall konnte keine Bindung zwischen dem markierten Protein und dem Liganden festgestellt werden (Abb. 25 B). Wie zuvor für GabR aus *B. subtilis* beschrieben (229,230), ist die Bindung des Liganden in der C-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors PLP abhängig.



**Abbildung 25: EnuR bindet Na-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat *in vitro***

(A) Fluoreszenz-markiertes EnuR (200 nM) wurde mit einer seriellen Verdünnung (1:2) von Na-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat (Konzentrationen zwischen 200 μM und 3,6 nM) im Thermophoresepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween) titriert. (B) Fluoreszenz-markiertes EnuR\* (200 nM) wurde mit einer seriellen Verdünnung (1:2) von Na-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat (Konzentrationen zwischen 3,6 nM und 200 μM) titriert. Die MST Bindereaktionen wurden mit dem Monolith NT.015 bei 21°C gemessen und die Bindekonstante ( $K_D$ ) aus einer Ausgleichsrechnung der erhaltenen Daten berechnet. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

#### 4.5.7 Protein-DNA-Interaktionsstudien

EnuR ist ein Transkriptionsregulator mit einem putativen N-terminalen helix-turn-helix Bindemotiv. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass das Protein in Lösung in einer korrekt gefalteten, dimeren Konformation vorliegt. Um die mögliche Bindung von EnuR und seinem Lys-302/His-Derivat an die Promotorregion vor *uehA* nachzuweisen, wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zwei DNA-Fragmente stromaufwärts von *uehA* amplifiziert (Abb. 26). Das längere der beiden Fragmente umfasst 308 bp des 5'-Endes des *enuR*-Gens, die 97 bp *enuR-uehA* intergenen Region und 28 bp des *uehA* Gens. Das verkürzte Fragment umfasst ausschließlich 200 bp im *enuR*-Gen (Abb. 26). Es wurden 10 nM<sup>-1</sup> jedes DNA-Fragments mit ansteigender Konzentration von EnuR (0 nM<sup>-1</sup> bis 400 nM<sup>-1</sup>) inkubiert und anschließend elektrophoretisch getrennt. Als Bindungskontrolle wurde ein jeweils

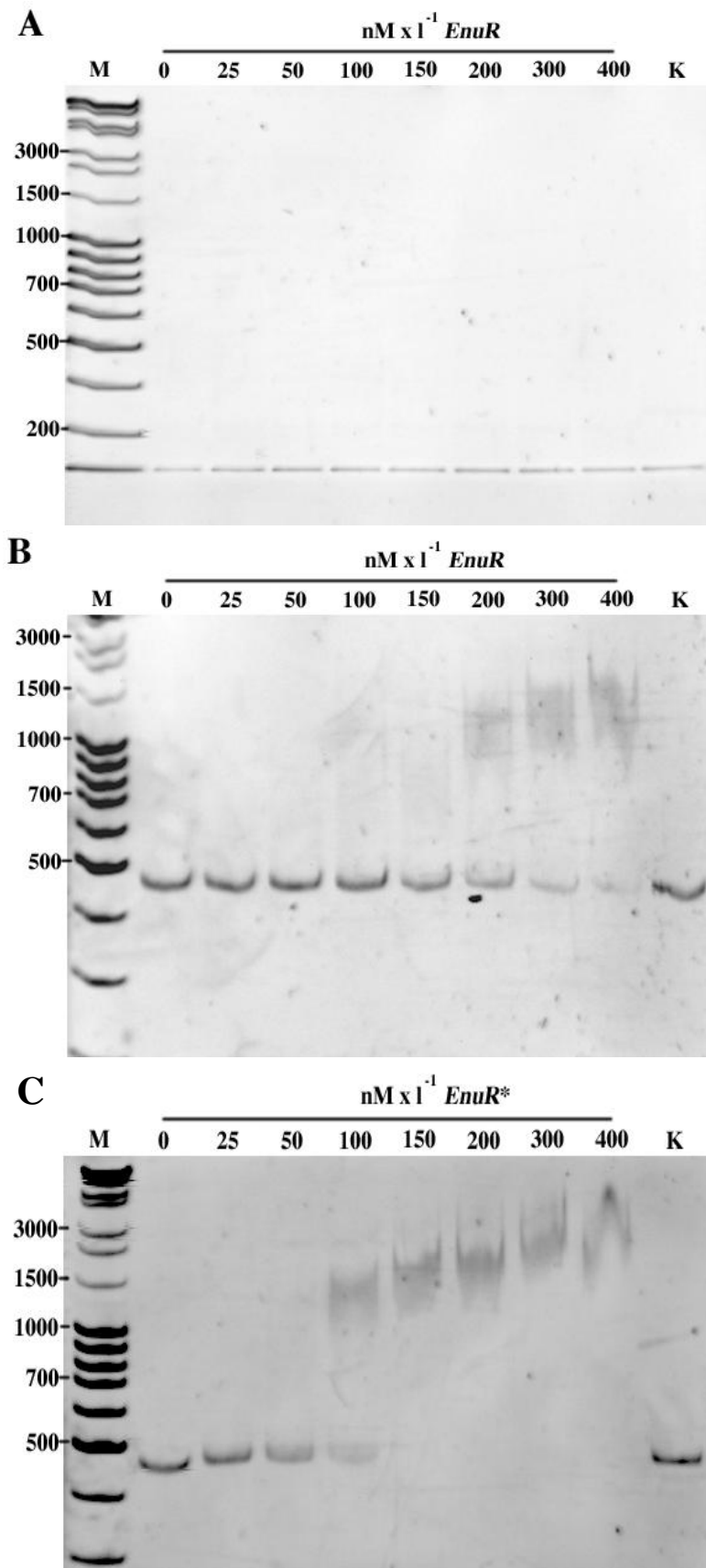
gleichgroßes Fragment aus dem *eutD*-Gen amplifiziert und mit der höchsten Proteinkonzentration inkubiert.



**Abbildung 26: Die DNA-Fragmente für das EMSA**

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 433 bp langen DNA-Fragments, die den 5'-Bereich des *enuR*-Gens, die intergene Region zwischen *enuR* und *uehA* und einen Teil des 3'-Bereiches von *uehA* umfasst (in schwarzen Klammern). Die Lage der Verkürzung ist durch eine rote Klammer markiert. Der Translationsstart von *uehA* und der Translationsstop von *enuR* sind gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 27 B erkennbar, bindet das Wildtyp-EnuR an ein DNA-Protein-Verhältnis von 1:20, das entspricht einer Proteinkonzentration von  $200 \text{ nM} \cdot \text{l}^{-1}$  an das 433 bp lange DNA-Fragment. Es zeigt jedoch keine Bindeaffinität zu dem Kontrollfragment. Auf dem Gel wird nur eine Verschiebung zwischen ungebundener DNA und DNA-Protein-Komplex deutlich. Es kann geschlossen werden, dass das EnuR-Dimer auf der untersuchten DNA-Sequenz nur eine Bindestelle hat und spezifisch an diese bindet. Zu dem untersuchten 200 bp Fragment weist EnuR keine Bindeaffinität auf (Abb. 27 A). Die Bindestelle des EnuR-Dimers liegt daher auf den 205 bp stromaufwärts des *uehA*-Startcodons (Abb. 26).



**Abbildung 27:**

**Electrophoretic Mobility Shift**

**Assay von EnuR und EnuR\***

10  $\text{nM} \times \text{l}^{-1}$  des 200 bp Fragments stromaufwärts von *uehA* (A) oder des 433 bp Fragments (B und C) wurden ohne und mit steigenden Konzentrationen von EnuR (25 - 400  $\text{nM} \times \text{l}^{-1}$ ) (A und B) oder EnuR\* (C) inkubiert und anschließend elektrophoretisch in einem nativen 6 % Polyacrylamidgel bei 90 V getrennt. Als Marker wurde der MassRuler DNA Ladder Mix von Thermo Fisher genutzt.

Die Lys-302/His-Mutante EnuR\* bindet im Gegensatz zum Wildtyp-EnuR bereits ab einem DNA:Protein-Verhältnis von 1:10 (Proteinkonzentration von  $100 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$ ) (Abb. 27 C). EnuR\* bindet daher mit einer höheren Affinität an das 433 bp-Fragment als das Wildtyp-Protein. Im Einklang mit EnuR hat EnuR\* nur eine Bindestelle auf dem untersuchte DNA-Fragment, bindet aber nicht an das Kontrollfragment aus *eutD*. Die Bindung von EnuR\* an das 433 bp Fragment ist daher spezifisch.

#### 4.6 Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle des *uehA*-Promotors

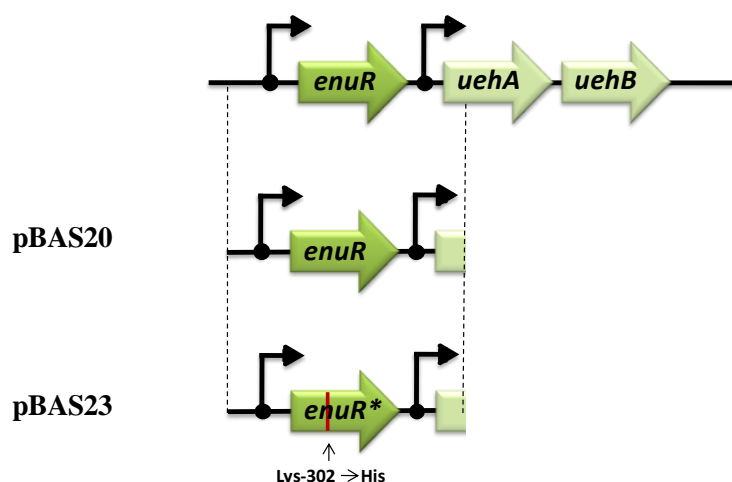
Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass nur der vor *uehA* gelegene Promotor (Abb. 16) substratinduzierbar ist. Diese Substratinduktion ist unter anderem der Repression des Promotors in 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abwesenheit durch den MocR/GabR-Typ Transkriptionsregulator (126,228) EnuR geschuldet. Die vorliegenden *in vitro* Daten belegen, dass EnuR das Pyridoxyl-5'-Phosphat als prosthetische Gruppe enthält und dessen Ligandenbindung von diesem Cofaktor abhängt. Die systematische Deletion verschiedener Gene des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons in *R. pomeroyi* DSS-3 und die daran anknüpfenden Wachstumsversuche deuten auf Einflüsse weiterer Transkriptionsfaktoren hin. Im Folgenden sollen die Regulatoren und deren Mechanismen näher charakterisiert werden.

##### 4.6.1 Charakterisierung der Funktion von EnuR

###### 4.6.1.1 Die PLP-Abhängigkeit von EnuR *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die PLP-Bindung durch EnuR *in vitro* verhindert werden kann, wenn Lys-302 durch Histidin ersetzt wird. Auf die Ausbildung der quaternären Struktur des Proteins hatte diese Mutation keinen Einfluss, sie führte jedoch zu einer erhöhten Affinität zu der DNA stromaufwärts von *uehA* (Abb. 24 und 27). Bereits in früheren Studien von MocR/GabR-Typ Regulatoren (126,228) konnte gezeigt werden, dass deren regulatorische Funktionen von ihrem PLP-Cofaktor abhängig sind (226,227). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob dies auch für EnuR der Fall ist und die Verhinderung der PLP-Koordination in EnuR einen Einfluss auf die Transkription des  $P_{uehA}$  hat. Dazu wurde mittels gerichteter Mutagenese das PLP-bindende Lysin-302 in der  $P_{enuR^-}enuR^+P_{uehA^-}lacZ$ -Fusion (auf Plasmid pBAS20) gegen ein Histidin ausgetauscht. Das erstellte Plasmid ( $P_{enuR^-}enuR^+P_{uehA^-}lacZ$  auf pBAS23; Abb. 14) wurde in *R. pomeroyi* ASR7 [ $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)$ ]1 konjugiert, um einen Einfluss des chromosomalen *enuR* zu verhindern. Die LacZ-Aktivität wurde anschließend, wie bereits beschrieben, gemessen.

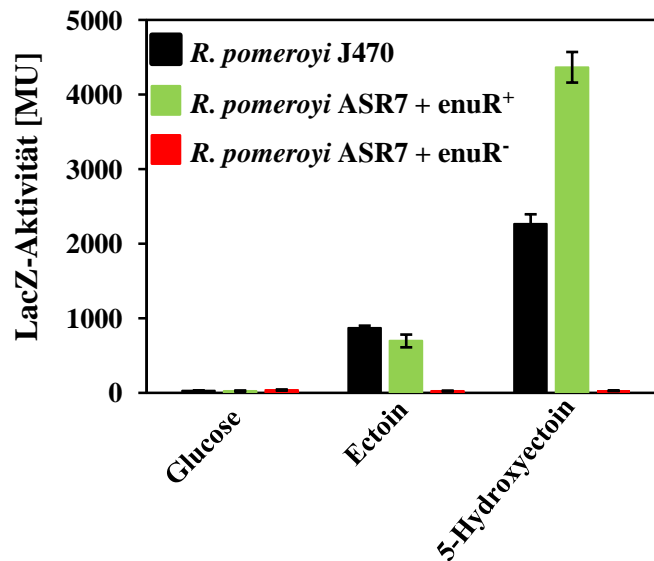




**Abbildung 28: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der *lacZ*-Fusionen für die Reporteranalysen**

Dargestellt ist die schematische Organisation der 5'-Region des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons. Die zwei putativen Promotoren sind als gebogene Pfeile dargestellt. Die Abgrenzungen für die Reportergenfusionen sind mit gestrichelten Linien markiert. Der durch gerichtete Mutagenese eingeführte Codonaustausch in *enuR* ist als roter Balken dargestellt. Die Bezeichnung des aus der Fusion resultierenden Plasmids ist angegeben.

Aus Abbildung 29 geht hervor, dass, wie bereits für Abbildung 17 beschrieben, eine Einführung der  $P_{enuR}-enuR^+-P_{uehA}-lacZ$ -Fusion in den  $\Delta(enuR_{1-975})$ -Hintergrund zu einem *enuR*<sup>+</sup>-Stamm führt. Im LacZ-Assay ist daher ein wildtypähnliches Expressionsmuster zu beobachten (Abb. 18 und 29). Interessanterweise steigt die Expression bei Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin auf etwa das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp. Durch die Mutation des Lysin-302 und dem damit verbundenen Verlust des PLP wird die Expression ausgehend von  $P_{uehA}$  unter allen getesteten Bedingungen auf ein Basalniveau reduziert ( $31 \pm 7$  MU) (Abb. 18). Dies entspricht quantitativ dem Expressionsniveau der Glucosekontrolle für  $P_{uehA}$  oder auch der Intensität der  $P_{enuR^-}$ -Expression (Vergleiche auch Tabelle A1). Ein Verlust von EnuR führt also zu einem konstitutiv aktiven Promotor vor *uehA*, der Verlust der prosthetischen Gruppe PLP dagegen führt zu einer konstitutiven Repression der Transkription von dem selbigen. EnuR\* kann auch in Anwesenheit von Ectoinen, nicht mehr von der DNA gelöst werden. Die Aufhebung der Repression durch EnuR ist daher PLP-abhängig.



**Abbildung 29: Expressionsmuster der  $P_{enuR^-}enuR^*P_{uehA^-}lacZ$ -Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR^-}enuR^*P_{uehA^-}lacZ$ -Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$  (grün) und der  $P_{enuR^-}enuR^*P_{uehA^-}lacZ$ -Fusion in *R. pomeroyi* ASR7  $\Delta(enuR_{1-975}::Gm)1$  (rot). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$ , Ectoin oder 5-Hydroxyectoin bei 30°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

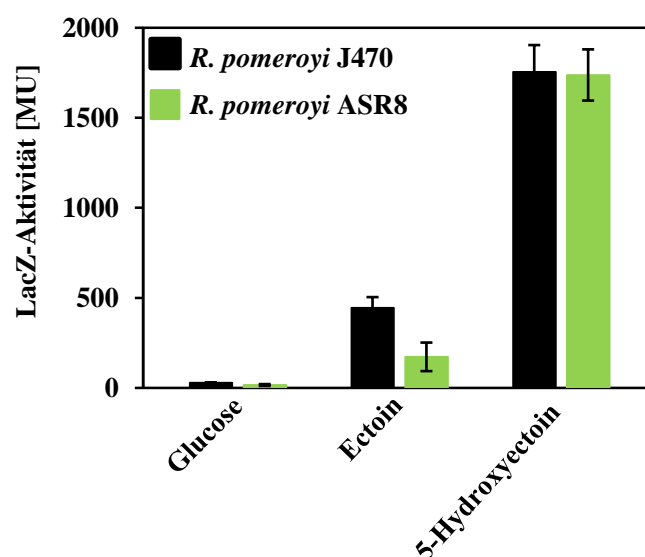
#### 4.6.1.2 EnuR-Induktor-Interaktionen *in vivo*

##### 4.6.1.2.1 Die Induktion der Transkription ausgehend von $P_{uehA}$ ist EutD-abhängig

In den *in vitro* Bindestudien in Abschnitt 24 wurde bereits gezeigt, dass das gebildete Intermediat aus der Ectoinhydrolyse durch EutD (Abb. 3),  $N\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat, an EnuR bindet und diese Bindung PLP-abhängig ist. Ob dieses Intermediat des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus auch *in vivo* mit EnuR interagiert, wurde getestet, indem die  $P_{enuR^-}enuR^*P_{uehA^-}lacZ$ -Fusion auf Plasmid pBAS20 in die  $\Delta(eutD::Gm)1$ -Mutante (Stamm ASR8) konjugiert wurde.

Eine Deletion des *eutD*-Gens aus dem katabolen *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon führt zu einem starken Verlust der Genexpression ausgehend von  $P_{uehA}$ , wenn Ectoin als Substrat vorliegt (Abb. 30). Die Promotoraktivität wird um das 2,5-fache im Vergleich zur Wildtypkontrolle gesenkt und hat einen absoluten Wert von  $172 \pm 79$  MU (Tab A1).  $P_{uehA}$  ist jedoch weiterhin voll induziert, wenn der entsprechende *R. pomeroyi* ASR8-Stamm auf 5-Hydroxyectoin kultiviert wird ( $1732 \pm 142$  MU). Wie bereits aus den *in vitro* Interaktionsstudien zu erwarten gewesen war, ist das Reaktionsprodukt der

enzymatischen Reaktion von EutD für die Induktion der Transkription von  $P_{uehA}$  notwendig. N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat ist auch *in vivo* ein Ligand des Regulators EnuR und damit der interne Induktor für die Aufhebung der Repression von  $P_{uehA}$ , wenn Ectoin als Substrat im Medium vorliegt. Dies ist nicht der Fall für die Induktion der Transkription wenn 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle im Medium vorhanden ist (Abb. 30). Es muss angemerkt werden, dass das Expressionsniveau im Vergleich zum Wildtyp zwar niedriger liegt, jedoch immer noch um einen Faktor 6 erhöht ist, im Vergleich zu dem Expressionsniveau unter vollständig reprimierten Bedingungen durch EnuR\* und im Vergleich zu der Glucosekontrolle (Abb. 29 und 30).



**Abbildung 30: Expressionsmuster der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR8 [ $\Delta(eutD::Gm)1$ ]**

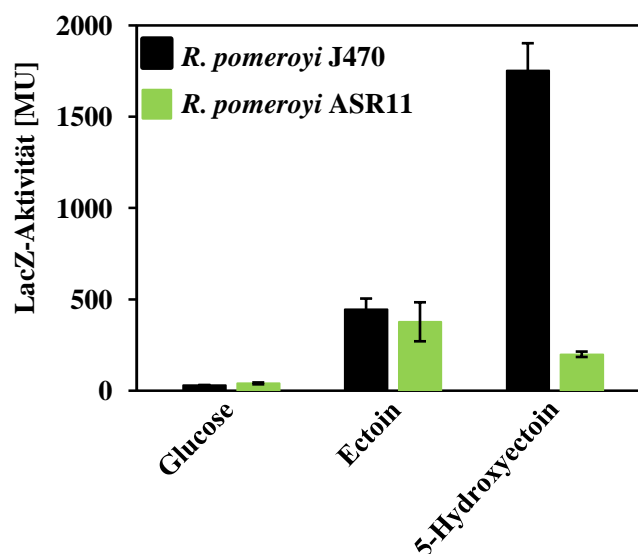
Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR8 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden in einer Konzentration von 28 mM zugesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

#### 4.6.1.2.2 Die Induktion der Transkription ausgehend von $P_{uehA}$ ist EutABC-abhängig

Wie bereits gezeigt, kann eine  $\Delta(eutABC::Gm)1$ -Mutante (Stamm ASR11) ohne erkennbaren Wachstumsphänotyp Ectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen, nicht aber 5-Hydroxyectoin. Um den internen Induktor für die transkriptionelle Kontrolle des 5-Hydroxyectoinkatabolismus durch EnuR zu identifizieren, wurde die  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ -

*lacZ*-Fusion auf Plasmid pBAS20 in die  $\Delta(eutABC::Gm)1$ -Mutante konjugiert und unter den oben beschriebenen Bedingungen für ein LacZ-Assay kultiviert.

Eine chromosomale Deletion der katabolen Gene für den 5-Hydroxyectoin-Abbau (*eutABC*) führt zu einem starken Verlust der Genexpression ausgehend von  $P_{uehA}$ , wenn 5-Hydroxyectoin das im Medium enthaltene Substrat ist. Die Expression vermindert sich in diesem Fall um das 9-fache und sinkt auf  $198 \pm 15$  MU (Tab A1). Es liegt damit auf dem gleichen quantitative Niveau wie die Ectoin-abhängige Expression in der  $\Delta(eutD::Gm)1$ -Mutante (Abb. 30 und 31). Die gemessene LacZ-Aktivität der mit Ectoin kultivierten Kulturen ist im  $\Delta(eutABC)$ -Hintergrund gleich der im Wildtyp-Hintergrund (Abb. 31; Tab A1). Eine *eutABC*-Deletion hat daher keinen Einfluss auf die Promotoraktivität von  $P_{uehA}$ , wenn Ectoin das Substrat ist. Wenn aber 5-Hydroxyectoin im Medium vorhanden ist, ist die Expression des katabolen Ectoin-Genclusters von einem internen Induktor abhängig, der durch die enzymatischen Reaktionen von EutA, EutB und/oder EutC entsteht. Es muss auch in diesem Zusammenhang angemerkt werden, dass die Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp zwar stark reduziert ist, aber dennoch um einen Faktor 8 erhöht ist, gegenüber dem Expressionsniveau unter vollständigen reprimierten Bedingungen durch  $EnuR^*$  und gegenüber der Glucosekultur (Abb. 29 und 31).



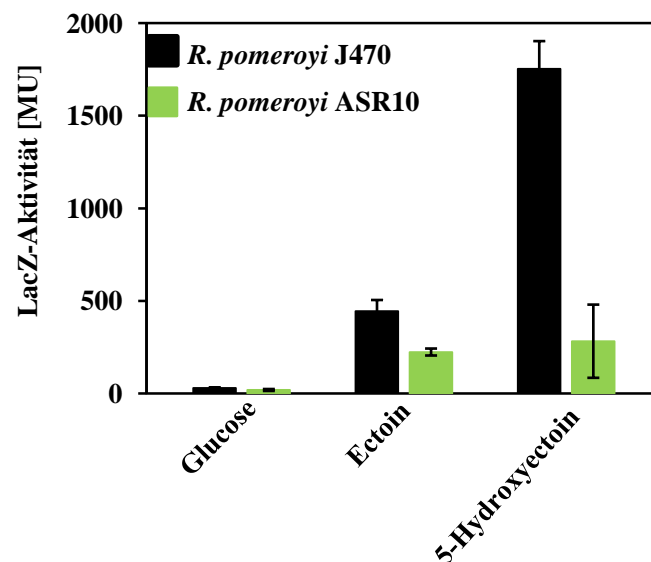
**Abbildung 31: Expressionsmuster der  $P_{enuR^*}-enuR^+-P_{uehA}$ -*lacZ*-Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR11 [ $\Delta(eutABC::Gm)1$ ]**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR^*}-enuR^+-P_{uehA}$ -*lacZ*-Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR11 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden in einer Konzentration von 28 mM zugesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

#### 4.6.2 Der Einfluss weiterer Transkriptionsaktivatoren auf $P_{uehA}$

##### 4.6.2.1 Der Transkriptionsregulator AsnC

Eine Deletion der katabolen *ssd* und *atf*-Gene des zu untersuchenden Operons hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 auf Ectoinen (Abb. 12 G). Werden diese Gene jedoch gemeinsam mit dem Regulatorgen *asnC* deletiert, ist ein Wachstum auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin nicht mehr möglich (Abb. 12 H). Um zu untersuchen, ob dieser Lrp/AsnC-Typ Transkriptionsregulator einen Einfluss  $P_{uehA}$  ausübt oder stattdessen an anderer Stelle im Operon regulatorisch eingreift, wurde die  $P_{enuR^-enuR^+}P_{uehA^-lacZ}$ -Fusion auf Plasmid pBAS20 in die  $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$ -Mutante (Stamm ASR10) konjugiert und wie bereits beschrieben für die LacZ-Assays kultiviert.



**Abbildung 32: Expressionsmuster der  $P_{enuR^-enuR^+}P_{uehA^-lacZ}$ -Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR10 [ $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$ ]**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR^-enuR^+}P_{uehA^-lacZ}$ -Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR10 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden in einer Konzentration von 28 mM zugesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

Die Deletion des Regulatorgens *asnC* und den in der Operonstruktur folgenden katabolen Genen *ssd* und *atf*, führen zu einer starken Reduktion der Expression von  $P_{uehA}$ , wenn entweder Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Substrat vorhanden sind. Die Promotoraktivität der Ectoin-Kulturen geht um die Hälfte zurück ( $222 \pm 19$  MU), die der 5-Hydroxyectoin-Proben um etwa das 6-fache ( $281 \pm 19$  MU) (Abb. 32; Tab A1). Die Wiederholung des Experiments

im  $\Delta(ssd-atf::Gm)1$ -Hintergrund (Stamm ASR14) führte zu keiner signifikanten Verminderung der Expression ausgehend von  $P_{uehA}$  (Abb. A5). Der Verlust der Aktivierung der Transkription ist daher auf das Fehlen des Transkriptionsregulators AsnC zurückzuführen. AsnC ist ein Aktivator des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons und beeinflusst so den Promotor vor *uehA*. Es ist dennoch anzumerken, dass der Promotor auch unter diesen Bedingungen, nicht vollständig an Aktivität verliert, sondern eine 8-fach erhöhte Expression gegenüber dem nicht-induzierten Level erhalten bleibt (Abb. 29 und 32).

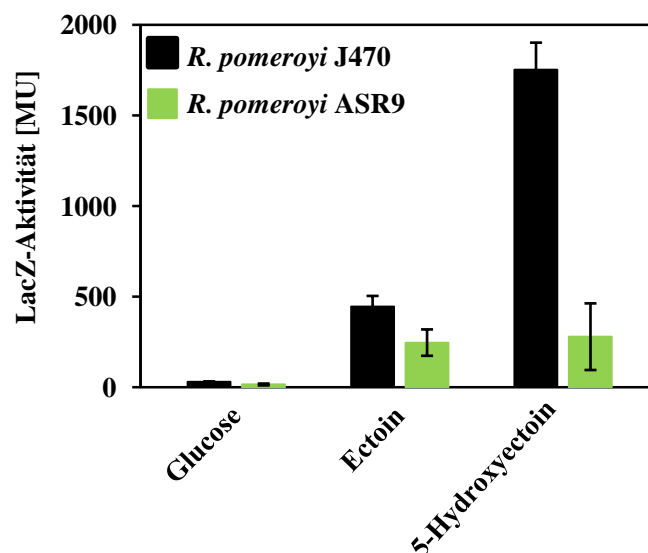
#### 4.6.2.2 Das Zweikomponentensystem NtrXY

Das bereits beschriebene NtrXY-Zweikomponentensystem (Abschnitt 3.5.2.1) ist in die generellen Stickstoffkontrolle involviert (18,266,267). Ectoin und 5-Hydroxyectoin sind im marinen Habitat vermutlich wichtige Stickstoffquellen und bedeuten einen entscheidenden Wachstumsvorteil für jene Mikroorganismen, die deren Anwesenheit im Medium schnell registrieren. Mit Hilfe des TOPCON-Servers wurde die Membrantopologie der NtrY-Sensorkinase berechnet (291), wodurch vier Transmembrandomänen bestimmt werden konnten. Es wird neben einer kleinen periplasmatischen Domäne auch ein großer Bereich von etwa 200 Aminosäuren als periplasmatisch vorausgesagt, der möglicherweise als sensorische Domäne für Ectoin und 5-Hydroxyectoin fungieren könnte (Abb. A12). Dies ist äquivalent zu putativen Transmembranregionen, die bereits für NtrY aus *E. coli*, *Salomonella typhimurium* und *A. caulinodans* bestimmt wurden (18,268,269).

Die chromosomale Deletion des Zweikomponentensystems NtrXY führte zu einem Phänotyp, der kein Wachstum auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ermöglicht (Abb. 12 H). Dies spricht für eine wichtige sensorische Funktion der NtrY-Sensorkinase und eine wichtige regulatorische Funktion des NtrX-Antwortregulators. Aufschluss über den Einfluss des Zweikomponentensystems auf die Transkription des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Operons gab die  $P_{enuR-enuR^+}-P_{uehA}-lacZ$ -Fusion, die in den  $\Delta(ntrXY::Gm)1$ -Hintergrund (Stamm ASR9) konjugiert wurde. Die Kultivierung der entsprechenden Stämme und die Durchführung der LacZ-Assays erfolgte wie bereits beschrieben.

Die chromosomale Deletion der Gene des Zweikomponentensystems der globalen Stickstoffkontrolle NtrXY führt zu einem starken Rückgang der Transkriptionsrate ausgehend von  $P_{uehA}$ . Das Expressionslevel bei Wachstum unter Ectoin-Anwesenheit sinkt um das 2,3-fache auf  $195 \pm 14$  MU und für 5-Hydroxyectoin um das 6,3-fache auf  $278 \pm 18$  MU im Vergleich zur entsprechenden Wildtypkontrolle (Abb. 33; Tab A1), obwohl in diesem Stamm sowohl für *enuR*, als auch für *asnC* kodiert wird. In Verbindung mit dem Wachstumsphänotyp (Abb. 12 H) kann dem NtrXY-System ebenfalls eine wichtige regulatorische Rolle für das

katabole *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon zugesprochen werden. NtrX fungiert direkt oder indirekt als Aktivator gegenüber  $P_{uehA}$ . Dessen Deletion führt jedoch, wie bereits für AsnC beschrieben, nicht zu einem vollständigen Verlust der Aktivierung von  $P_{uehA}$ , da diese immer noch 8-mal höher ist, als der vollständig reprimierte Promotor in der Glucosekontrolle (Abb. 33).



**Abbildung 33: Expressionsmuster der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ -*lacZ*-Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR9 [ $\Delta(ntrXY::Gm)$ 1]**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ -*lacZ*-Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR9 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden in einer Konzentration von 28 mM zugesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

## 4.7 bioinformatische Untersuchungen

### 4.7.1 Die phylogenetische Verbreitung der katabolen Gene des 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-Abbaus

Die Ectoin-Hydrolase EutD ist das Schlüsselenzym sowohl des Ectoin- als auch des 5-Hydroxyectoin-Katabolismus. EutD öffnet den Ring der heterocyclischen Verbindung Ectoin (15,124,128) - eine Reaktion die in der Bildung des einzigen spezifischen Intermediats in der Verstoffwechselung von Ectoinen  $\text{N}\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat resultiert. Die Intermediate aller enzymatischen Folgereaktionen (Abb. 3) sind nicht spezifisch für den 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbau, sondern kommen im allgemeinen Aminosäurestoffwechsel zum Beispiel auch im Metabolismus von Glycin, Serin oder Threonin vor (144). Aus diesem

Grund wurde die Aminosäuresequenz von EutD aus *R. pomeroyi* DSS-3 genutzt, um mit Hilfe des Web-Servers des ‚genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute‘ (JGI) (292,293) in allen bis dato sequenzierten bakteriellen (Anzahl: 32.523) und archaealen (Anzahl: 654) Genomen nach Proteinhomologen zu suchen und diese auf das Vorhandensein von mindestens zwei weiteren Genen des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaus zu untersuchen. Es wurden 539 solcher vollständig sequenzierten und assemblierten Gencluster in Bakterien identifiziert, jedoch keine in Archaeen gefunden. Mit Hilfe des iTOL-Servers (294) konnte aus einem Aminosäuresequenzvergleich der entsprechenden EutD-Homologe ein phylogenetischer Baum erstellt werden (Abb. 35). Der Ursprung des Baumes wurde durch drei EutD-verwandte Proteine bestimmt [eine Peptidase des M24-Typs von *Mesorhizobium cicero* biovar WSM1271 (29% Sequenzidentität), eine Creatinase von *Pseudomonas monteilii* DSM 14164 (22% Sequenzidentität) und eine Xaa-Pro-Amino-peptidase aus *Rhizobium* sp. YR519 (26% Sequenzidentität)], die in der BLAST-Analyse eine hohe Ähnlichkeit zu dem EutD aus *R. pomeroyi* DSS-3 aufwiesen, aber keine weiteren 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaugene besaßen.

Bei Betrachtung des phylogenetischen Baumes wird deutlich, dass die Gene des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus ausschließlich in *Proteobacteria*, eines der drei am besten untersuchten bakteriellen Phyla (295), zu finden sind. Dabei gehören 58,6 % zu der Klasse der *Alphaproteobacteria* (316 Spezies), 14,5 % zu den *Betaproteobacteria* (78 Spezies) und 26,7 % zu den *Gammaproteobacteria* (144 Spezies). Es wurde nur ein Vertreter der *Deltaproteobacteria* [*Desulfovibrio bastinii* DSM 16055 (296)] gefunden.

Es befinden sich sowohl terrestrische, also auch marine Bakterien unter den vorhergesagten 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbauern. Dies steht im Einklang mit eben solchen Habitaten in denen auch Ectoin/5-Hydroxyectoin-produzierende Bakterien und Archaeen gefunden wurden (6,7). 5-Hydroxyectoin und Ectoin werden hauptsächlich von marinen *Alphaproteobacteria* von der Gattung *Roseobacter* und marinen *Gammaproteobacteria* *de novo* synthetisiert und als Schutzsubstanzen gegen osmotischen Stress genutzt (6,7). Der Ursprung der Fähigkeit Ectoine zu verstoffwechseln, liegt den vorliegenden Studien zufolge, ebenfalls bei marinen *Alphaproteobacteria* der Ordnungen *Rhodobacterales*, *Rhizobiales* und *Rhodospirillales* (Teil M1 in Abb. 35). Direkt gefolgt werden diese von einer Gruppe mariner *Gammaproteobacteria* der Familien *Vibrionaceae* und *Halomonadaceae* (Teil V und H in Abb. 35). Der nächste Zweig des phylogenetischen Baumes umfasst wieder eine Gruppe mariner Bakterien der Ordnungen *Rhodobacterales* und *Rhodospirillales* (Teil M2 in Abb. 35) und des Genus *Thalassospira* (Untergruppe T in Abb. 35), an welche sich die Familie der *Enterobacteriaceae* (Untergruppe E in Abb. 35) aus der Klasse der *Gammaproteobacteria* anschließt. Der nächste große Zweig in der Abstammungsreihe wird von dem Genus *Burkholderia* (Untergruppe B) der *Betaproteobacteria* gebildet. Es schließt



sich wieder eine Gruppe von *Gammaproteobacteria* des Genus *Pseudomonas* (Untergruppe P) an. Die Vertreter der Untergruppen B, E und P sind hauptsächlich im terrestrischen- oder Süßwasserhabitat zu finden. Da der nächst verwandte Zweig des phylogenetischen Baumes (Untergruppe T) jedoch im marinen Habitat angesiedelt ist, ist von einem horizontalen Gentransfer zwischen den Subgruppen auszugehen. Gleiches gilt für die einzelnen Spezies, die im phylogenetischen Baum außerhalb ihrer taxonomischen Zugehörigkeit auftreten (*Pseudomonas bauzanensis* W13Z2, *Verminephrobacter* sp. A1M und *Desulfovibrio bastinii* DSM 16055). Der dritte marine Zweig der *Alphaproteobacteria* (Untergruppe M3) unterscheidet sich von den vorhergehenden in seiner Diversität. Neben mehreren Spezies des Genus *Roseobacter*, befinden sich hier unter anderem auch Vertreter des Genus *Aurantimonas* oder *Salinarimonas* (Abb. 35). Im letzten Abschnitt des phylogenetischen Baumes sind die terrestrischen *Alphaproteobacteria* angesiedelt. Diese lassen sich in die zwei Untergruppen der *Agrobacteria* (Teil A) und *Rhizobia* (Teil R) unterteilen. Sie gehören zum großen Teil zur Familie der *Rhizobiales*.

#### 4.7.2 genomischer Kontext des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucusters

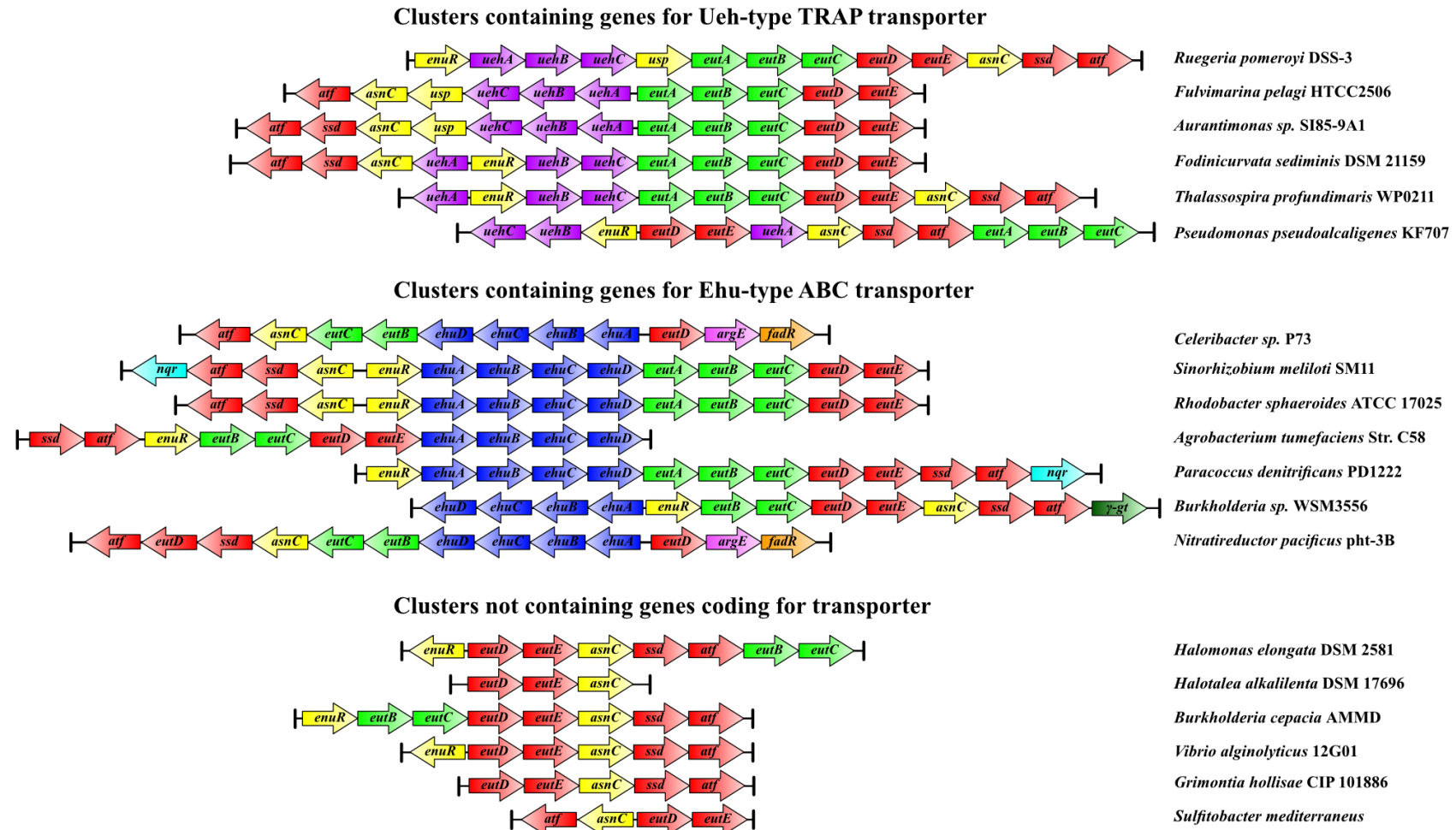
Mit Hilfe des Neighbourhood Programms des ‚genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute‘ (<http://genome.jgi.doe.gov/>) (JGI) (292,293) wurde der genomische Kontext der gefundenen 539 putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbauern analysiert. Dabei wurde deutlich, dass im Gegensatz zu der geringen taxonomischen Diversität des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaus, die genetische Diversität sehr groß ist. Wie bereits zuvor in einer kleineren Studie von Schwibbert et al. (2011) aufgezeigt, variiert nicht nur die Anzahl der vorhandenen Gene im Gencluster, sondern auch deren Anordnung. In Abbildung 35 werden einige Beispiele für diese unterschiedlichen Genanordnungen dargestellt. Dabei wurden diese anhand der An- oder Abwesenheit von Transportern, die innerhalb des Genclusters kodiert wurden, gruppiert.

In diesem Zusammenhang muss auch angemerkt werden, dass sieben der 539 untersuchten bakteriellen Spezies mehr als ein kataboles Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gencluster enthält. Bei diesen handelte es sich entweder um eine einfache Duplikation des gesamten Genclusters an einer anderen Stelle im Genom, oder aber um ein Gencluster, dass nach dem oben beschriebenen Kriterien dem Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus zugesprochen werden kann, sich aber sowohl in der Anzahl und Anordnung der Gene, als auch in der Aminosäuresequenz von EutD, von dem ersten Cluster unterscheidet. In die erste Gruppe gehören die folgenden bakteriellen Spezies: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2297, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Rhizobiales* sp. HL-109, *Ensifer meliloti* AK83, DSM 23913. In die zweite benannte Gruppe sind *Mesorhizobium loti* NZP2037,

*Pseudomonas putida* KT2440 und *Mesorhizobium loti* MAFF303099 einzuordnen. Für diese Vertreter wurde in der Darstellung des phylogenetischen Baums nur eines der beiden Gencluster betrachtet (Abb. 35).

Der genetische Kontext, das heißt die An- oder Abwesenheit verschiedener Gene oder Gengruppen, in den 539 Genclustern der putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbauer wurden am phylogenetischen Baum (Abb. 35) markiert.

Die katabole Nutzung von 5-Hydroxyectoin und Ectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle hängt vom Transport dieser in die bakterielle Zelle ab. Im 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucuster von *Sinorhizobium meliloti* befinden sich 4 Gene (*ehuABCD*) welche für einen Ectoin/5-Hydroxyectoin-spezifischer ABC-Transporter kodieren (124,179). In *R. pomeroyi* dagegen wird ein substratinduzierter TRAP-Transporter (*uehABC*) co-transkribiert (15,127,297). In den 539 identifizierten putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucustern wurden 370 Gencluster identifiziert, die die Gene für einen ABC-Transporter enthalten, der dem Ehu-Typ entspricht (Aminosäuresequenzvergleich beispielhaft in Abb. A6). Diese kommen in allen Untergruppen, außer in Untergruppe V und H (Abb. 35) vor. In 48 Genclustern wird ein TRAP-Transporter kodiert, der dem Ueh-Typ entspricht (Aminosäuresequenzvergleich beispielhaft in Abb. A7). 121 der identifizierten 539 Genome wiesen keine Transportergene in der direkten Nachbarschaft des *eutD*-Gens auf (Abb. 34 und 35). Dazu gehört unter anderem *Halomonas elongata*, dessen Fähigkeit zur Verstoffwechselung von Ectoinen bereits beschrieben wurde (128). *H. elongata* ist jedoch in der Lage Ectoin und 5-Hydroxyectoin über einen osmotisch induzierbaren TRAP-Transporter (*teaABC*) aufzunehmen, wenn diese als Osmoprotektiva benötigt werden (189,190). Die Kristallstrukturen der Substratbindepoteine (SBP) der drei Ectoin/5-Hydroxyectoin-spezifischen Transporter wurden bereits untersucht und deren Substratbindung ist auf molekularer Ebene verstanden (125,127,190). Dabei wurde deutlich, dass die Substratbindetasche der SBPs des Ueh-Typ TRAP-Transporters und des Tea-Typs deckungsgleich sind (125,127), wie auch aus den beispielhaften Aminosäuresequenzvergleichen in Abb. A7 und A8 hervorgeht. Unter Inbetrachtziehung der Möglichkeit, dass der Tea-Typ TRAP-Transporter die substratinduzierte Aufnahme der Ectoine ebenfalls gewährleisten könnte, wurden die Genome derer, die keine Transporter im Gencluster kodieren, zusätzlich nach dessen Anwesenheit untersucht. Tatsächlich konnten 23 Spezies identifiziert werden, die einen solchen enthielten (Abb. 35 und A8). Diese Beobachtung ist jedoch auf wenige Vertreter der *Gammaproteobacteria* der Untergruppen V und H beschränkt, die gleichzeitig in der Lage sind Ectoin/5-Hydroxyectoin zu synthetisieren (Abb.35).



**Abbildung 34: Beispiele der genetischen Anordnungen der Gencluster des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus**

Die Gruppen wurden entsprechend der Anwesenheit oder Abwesenheit von Genen arrangiert, die für einen Transporter (Ueh-Typ TRAP-Transporter oder EhuB-Typ ABC-Transporter) kodieren. Blaue (ABC-Transporter) und lilafarbene (TRAP-Transporter) Pfeile stehen für Transportergene. Grün (5-Hydroxyectoin) und Rot (Ectoin) stehen für die katabolen Abbaugene. Gelbe Markierungen beschreiben Regulatorgene.

Das erste Gen den 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucusters in *R. pomeroyi* DSS-3 kodiert für eine Transkriptionsfaktor der MocR/GabR-Subfamilie der GntR-Transkriptionsfaktoren (126,228). Von den 539 untersuchten Genclustern besitzen 456 ein *enuR*-Gen (Abb. 35). Besonders auffällig ist dabei, dass an der Wurzel des phylogenetischen Baumes kein Ectoin/5-Hydroxyectoin-Abbaucuster ein *enuR*-Gen enthält und *enuR* erst im Verlauf der Evolution in das Cluster integriert wurde. Ab der Untergruppe T (Abb. 35) ist dieser Regulator, mit wenigen Ausnahmen, in fast allen Genclustern vorhanden. In einem Aminosäuresequenzvergleich aller 456 EnuR-Typ Regulatoren liegt die Sequenzidentität zwischen 88 % (*Roseobacter* sp. SK909-2-6) und 47 % (*Sinorhizobium meliloti* MVII-I). In Abbildung A9 wurden beispielhaft Aminosäuresequenzen von 15 Spezies des vorliegenden phylogenetischen Baumes miteinander verglichen. In diesem Sequenzvergleich wird deutlich, dass nicht nur das Lysin (in *R. pomeroyi* DSS-3 Lysin-302) für die kovalente Bindung des PLP-Cofaktors in allen 456 Sequenzen konserviert ist, sondern auch dass alle anderen Aminosäuren, die für die Koordination des Cofaktors PLP von Bedeutung sind, funktionell konserviert sind.

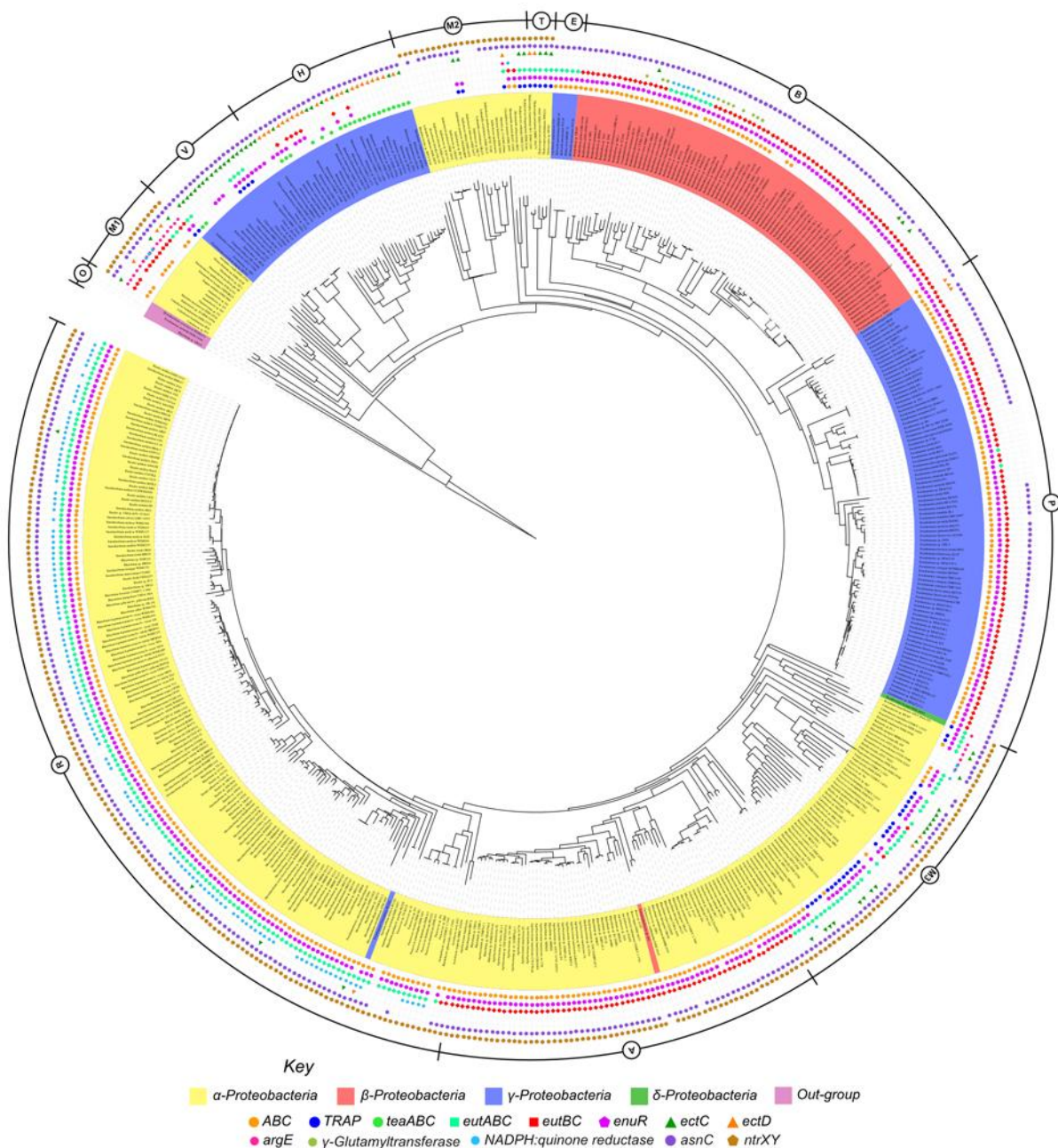
In Schulz et al. (2016) (persönliche Kommunikation J. Heider) wurde erstmals ein möglicher enzymatischer Weg für den Abbau von 5-Hydroxyectoin zu Ectoin beschrieben. In *R. pomeroyi* DSS-3 sind den Voraussagen zufolge drei Genprodukte (*EutABC*) für diese Konvertierung nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben solchen bakteriellen Spezies, die dieses Set von Genen für den 5-Hydroxyectoinabbau besitzen, auch solche gefunden, die im untersuchten Gencluster nur die Gene *eutB* und *eutC* enthalten und solche Organismen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu *eutD* keine Gene für den putativen 5-Hydroxyectoinabbau enthalten. Dabei ist das Verhältnis zwischen denen, die *eutABC* besitzen und jenen, die nur für *eutBC* kodieren mit 228 zu 240 Spezies ausgeglichen. Wie für das *enuR*-Gen zeigt sich auch für die Gene des 5-Hydroxyectoinabbaus, dass diese in der Nähe des Ursprungs des phylogenetischen Baumes nur selten auftreten und erst ab der Untergruppe T, mit wenigen Ausnahmen, durchweg vorhanden sind.

In einer Vielzahl der analysierten Gencluster sind Gene kodiert, die zu vor nicht in *R. pomeroyi* DSS-3 oder *S. meliloti* gefunden wurden. Dazu gehört der Austausch des *eutE*-Gens gegen die N-acetylornithine deacetylase *argE*. Letzteres ist in die Arginin-Biosynthese involviert und katalysiert die Spaltung der Amidbindung von N-Acetyl-L-Ornithin, was zur Freisetzung von Ornithin und Acetat führt (298). Funktionell sind diese Amidohydrolasen daher gegeneinander austauschbar und sollten den gleichen Reaktionsverlauf ermöglichen (Abb. 3). Da 17 der gefundenen 25 Substitutionen von *eutE* durch *argE* am Ursprung des phylogenetischen Baumes auftreten, ist die Vermutung naheliegend, dass das für

*R. pomeroyi* DSS-3 beschriebene *eutE* erst im Laufe der Evolution des katabolen Ectoin-Genclusters entstand (Abb. 34 und 35). Zusätzlich wurden in vielen Genclustern Gene identifiziert, die entweder für eine NADPH:quinone Reduktase (137 mal) oder eine  $\gamma$ -Glutamyltransferase (13 mal) kodieren. Hierbei fällt auf, dass das Vorhandensein einer  $\gamma$ -Glutamyltransferase ausschließlich auf wenige Spezies des Genus *Burkholderia* (Untergruppe B) beschränkt ist. Die NADPH:quinone Reduktase dagegen, mit Ausnahmen, hauptsächlich in den katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Genclustern der Untergruppe R zu finden ist (Abb. 35).

Unter den 539 potentiellen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbauern befinden sich 100, deren Genomsequenzen ebenfalls die konservierten Gene der Ectoinsynthese (*ectABC*) (74,91) besitzen. Zusätzlich konnte in 33 dieser 100 Stämme ein *ectD*-Gen gefunden werden, welches für die 5-Hydroxyectoin-Synthese benötigt wird (94,299). Diese Organismen sollten daher in der Lage sein, sowohl die Synthese als auch den Abbau dieser Aminosäurederivate durchzuführen. Die Fähigkeit entweder Ectoin oder 5-Hydroxyectoin synthetisieren zu können, ist hauptsächlich unter den bakteriellen Spezies in der Nähe des Ursprungs des vorliegenden auf *eutD*-basierenden Stammbaumes verbreitet. Dabei ist besonders auffällig, dass diese Gene in allen Bakterienspezies der Untergruppen V und H vorhanden sind (Abb. 35). Der für die industrielle Produktion von Ectoinen genutzte *H. elongata* ist ein bedeutender Vertreter dieser Untergruppe (70).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass der Transkriptionsregulator *asnC* aus dem *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon von *Ruegeria pomeroyi* als ein Aktivator auf den Promotor vor *uehA* wirkt. Von den 539 analysierten katabolen Genclustern in dem vorliegenden phylogenetischen Baum, wird in nur 50 kein *asnC* im Gencluster kodiert. Insbesondere am Ursprung des Baumes, wo noch kein *enuR*-Gen vorhanden ist, ist *asnC* in jedem Gencluster vertreten. Ein Aminosäuresequenzvergleich aller AsnC-Aminosäuresequenzen (repräsentiert durch einen beispielhaften Vergleich von 15 Sequenzen in Abb. A10) zeigt eine hohe Aminosäure-Konservierung in der markierten helix-turn-helix-Domäne und der typischen Oligomerisierungs- und Effektorbindedomäne. Die höchste Sequenzidentität zu *asnC* aus dem *R. pomeroyi* DSS-3 Operon hatte dabei *asnC* aus dem, ebenfalls der *Rhodobacteraceae*-Familie zugehörige, *Phaeobacter gallaenciensis* ANG1 (95,6 %), die niedrigste bestand zu *Burkholderia cepacia* AMMD (41,7 %).



**Abbildung 35: Die phylogenetische Verbreitung des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus**

Dargestellt ist ein phylogenetischen Baum auf der Grundlage eines Aminosäuresequenzvergleichs von 539 Aminosäuresequenzen, die Homologien zu dem EutD Protein aus *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 aufwiesen. Die Sequenzen wurden durch eine BLAST-Suche auf dem JGI web-Server identifiziert und deren Sequenzen unter Verwendung von ClustalΩ verglichen. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des iTOL Web-Servers erstellt. Das Farbschema beschreibt die Verteilung von EutD unter den Klassen der *Proteobacteria*. Die Anwesenheit eines Transporters in unmittelbarer Nähe des *eutD* Gencluster wird durch ein orangefarbenen (ABC-Typ) oder dunkelblau (TRAP-Aktivität) Kreis angedeutet. Ein grüner Kreis zeigt das Vorhandensein eines TeaABC-Typ TRAP-Transporter.

Rosafarbene Fünfecke weisen auf eine Assoziation eines EnuR regulatorischen Gens mit dem *eutD*-Gencluster hin. Die Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin-Abbaugenen wird mit grünen (Vorhandensein von *eutABC*) oder roten (Vorhandensein von nur *eutBC*) Quadraten dargestellt. Das Vorhandensein von Genen, die nicht in den *eutD*-Genclustern von *S. meliloti* oder *R. pomeroyi* DSS-3 gefunden wurden, werden durch Kreise angezeigt: rosafarben (*argE*) , hellblau (NADPH:Quinon Reduktase) oder grün ( $\gamma$ -Glutamyltransferase). Die Anwesenheit eines *ectC*-Gens (Ectoin -Synthase) wird durch ein grünes Dreiecke angedeutet ; die zusätzliche Anwesenheit eines *ectD*-Gens in dem jeweiligen Genom durch ein orangefarbenes Dreieck. Eine größere Version des phylogenetischen Baums befindet sich auf der CD im Anhang.

Das Zweikomponentensystem NtrXY hat, wie bereits beschrieben, ebenfalls einen positiven Effekt auf die Transkription des Ectoin/5-Hydroxyectoin-Abbaucusters in dem hier untersuchen Modellorganismus *R. pomeroyi* DSS-3 . Die Genome der 539 bakteriellen Spezies, die putativ in der Lage sind 5-Hydroxyectoin und /oder Ectoin zu katabolisieren, wurden auf das Vorhandensein eines solchen NtrXY-Systems untersucht. Dabei wurde vorausgesetzt, dass sowohl ein Ortholog von NtrY (COG 5000) als auch NtrX (COG 2204) in einem Gencluster kodiert wurden. Es wurden 316 solcher Gencluster gefunden. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass diese in allen *Alphaproteobacteria* in dem vorliegenden phylogenetischen Baum vorkommen. Außerdem wurde ein entsprechendes Zweikomponentensystem in dem einzigen Deltaproteobakterium (*Desulfovibrio bastinii* DSM 16055) und dem Gammaproteobakterium (*Pseudomonas bauzanensis* W13Z2) gefunden, welche interessanter Weise außerhalb ihrer taxonomischen Zuordnungen gruppieren (Abb. 35).



---

## 5. Diskussion

---

Die Osmolarität des Wasser des Ozeans liegt bei etwa 1000 milliosmol je Liter. Damit übersteigt die Osmolarität des Meerwassers, die des Cytoplasmas der Zellen mariner Organismen (300 - 400 mOsmol) etwa um das dreifache (300). Um den Wasserverlust über die Zellmembran zu vermeiden, akkumulieren nicht nur Bakterien und Archaeen kompatible Solute, sondern auch die Zellen von Pilzen, Pflanzen und Tieren und passen den osmotischen Druck des Cytoplasmas so dem des Wachstumsmediums an (60,301–304). Die Schlüsselenzyme für die Synthese der Tetrahydropyrimidine Ectoin und seines Hydroxyderivats, 5-Hydroxyectoin sind weit verbreitet und konnten so nicht nur innerhalb des Reiches der *Bacteria* sondern auch der *Archaea* gefunden werden (6,7). Diese wenigen archaealen Spezies haben die Ectoin-Synthesegene vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben. Ectoine sind daher im wesentlichen von *Bacteria* genutzte kompatible Solute und kommen in etwa 7% der sequenzierten mikrobiellen Genome vor (6). Ihre Akkumulation im Cytoplasma ist entweder durch *de novo* Synthese oder durch die direkte Aufnahme aus dem Medium möglich (7,76,91,305). Die Freisetzung dieser Substanzen in das Wachstumsmedium als Folge von Zelltod und passivem, sowie aktivem Transport in den extrazellulären Raum (9,11,12), ermöglicht eine sekundäre Funktion dieser organischen Substanzen als wichtige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen (8). Ectoin und 5-Hydroxyectoin sind heterocyclische Verbindungen, deren mikrobielle Biosynthese gut verstanden ist. Der Katabolismus beider Aminosäurederivate hingegen ist nur unzureichend beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin in dem marinen Modellorganismus *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 auf physiologischer, genetischer und biochemischer Ebene untersucht.

### 5.1 physiologische Untersuchungen

#### 5.1.1 Der Einfluss verschiedener kompatibler Solute auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 bei erhöhter Osmolarität

Die meisten bakteriellen Spezies akkumulieren eine Reihe von verschiedenen kompatiblen Solute im Cytoplasma, wenn sie diese *de novo* synthetisieren. Die Zusammensetzung des internen Osmolytpools hängt dabei von der Höhe der externen Osmolarität, der Dauer der Stresssituation und der vorhandenen Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ab. Wenn jedoch nur ein kompatibles Solut in der Zelle gefunden werden kann, dann meist, weil dieses im Wachstumsmedium vorlag und effizient sowie energetisch günstiger in die Zelle transportiert werden konnte (75). Auch das marine Bakterium *R. pomeroyi* DSS-3 ist in der Lage im



Wachstumsmedium befindliche kompatible Solute aufzunehmen und sich dadurch vor osmotischem Stress zu schützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche kompatiblen Solute *R. pomeroyi* DSS-3 unter starkem Salzstress (1 M) (Abb. 10) aufnimmt, um einen Wachstumsvorteil zu erhalten. Es konnte eine eindeutige, aber geringe Protektion durch Cholin und dessen Derivat Glycinbetain, Carnitin und dessen Vorläufermolekül  $\gamma$ -Crotonobetain und Cholin-O-Sulfat festgestellt werden (Abb. 10). Die Fähigkeit von *R. pomeroyi* DSS-3 die benannten Moleküle unter osmotischem Stress zu akkumulieren, ist möglicherweise auf dessen Assoziation mit dem marinen Phytoplankton zurückzuführen. Carnitin ist in den Fettsäuremetabolismus von Pflanzen involviert, wodurch sowohl diese Substanz als auch deren Vorläufermolekül  $\gamma$ -Crotonobetain in hoher Abundanz im marinen Ökosystem vorkommt (306). Während Cholin-O-Sulfat als kompatibles Solut von Pflanzen synthetisiert wird (307), kommt Cholin in Form von Phosphatidylcholin in der pflanzlichen Zellmembran vor (308). Diese sind damit ebenfalls leicht zugängliche kompatible Solute für die hier untersuchte *Roseobacter*-Spezies *R. pomeroyi* DSS-3 (13,27–30). Die von anderen heterotrophen Bakterien häufig genutzten kompatiblen Solute (8), wie Ectoin, 5-Hydroxyectoin oder Prolin konnten von *R. pomeroyi* DSS-3 nicht zur Protektion vor Salzstress aufgenommen werden (Abb. 10).

### 5.1.2 Die substratinduzierte Aufnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin

Das Monophylum der *Roseobacter*, zu dem auch *R. pomeroyi* DSS-3 gehört, macht bis zu 20 % der Bakterioplanktongemeinschaft im küstennahen Bereich des marinen Lebensraums aus. Im offenen Ozean sind es nur noch etwa 10 % (28). Alle bisher sequenzierten Mitglieder des Monophylums (54 sind in der Roseobase hinterlegt, davon sind 7 vollständig annotiert; <http://www.roseobase.org/>) weisen eine hohe metabolische Diversität auf und können daher als ökologische Generalisten beschrieben werden (14,309,310). So können diese, darunter auch *R. pomeroyi* DSS-3, neben der normalen heterotrophen Lebensweise auch litotrophe Strategien zur Energiegewinnung anwenden, zu der unter anderem die Sulfid-Oxidation und die Kohlenstoffdioxid-Fixierung gehört (14,311). Das große und sehr vielfältige Genom von *R. pomeroyi* DSS-3 (~ 4600 kbp) ermöglicht diesem Bakterium eine Physiologie, die sich von anderen marinen Oligotrophen unterscheidet und somit einen evolutionären Vorteil in der Anpassung an das nährstoffarme, marine Habitat erlaubt (14).

Für Ectoin und 5-Hydroxyectoin konnte bereits in früheren Studien eine substratinduzierte Aufnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin über einen spezifischen TRAP-Transporter nachgewiesen werden (127). Durch Homologievergleiche mit dem katabolen Ectoin-Gencluster aus *S. meliloti* wurde vermutet, dass das *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon aus *R. pomeroyi* DSS-3 die Proteine kodiert, die für den

Abbau von Ectoin und 5-Hydroxyectoin notwendig sind. *R. pomeroyi* DSS-3 könnte somit in der Lage sein diese kompatiblen Solute zu katabolisieren und daher als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen (15,124,127). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der *R. pomeroyi*-Wildtyp sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff und Energiequelle nutzen kann und dass eine chromosomale Deletion des benannten Operons zu einem Wachstumsphänotyp führt, der die Verstoffwechselung dieser heterocyclischen Verbindungen nicht mehr ermöglicht (Abb. 12 A). Ectoine werden in einer untergeordneten Funktion, neben der Verwendung als kompatible Solute, von einigen bekannten Organismen auch als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle oder auch als Stickstoffspeicher genutzt (121,274,312). Die Gründe für den Katabolismus von Ectoinen scheinen dabei vielfältig und variieren abhängig vom Organismus. In *S. meliloti* und andere *Rhizobien* wird Ectoin unter erhöhten externen Osmolaritäten in großen Mengen aufgenommen, aber nicht im Cytoplasma akkumuliert. Ectoin scheint damit eher die Synthese endogener kompatibler Solute auszulösen und zu diesem Zweck als Nährstoffquelle genutzt zu werden (116). *H. elongata* dagegen kann Ectoin sowohl synthetisieren, als auch degradieren. Da beide Stoffwechselwege das Intermediat L-2,4-Diaminobutyrat gemeinsam haben und der Ectoin-Import ausschließlich von einem osmotisch induzierbaren TRAP-Transporter abhängt (127), ist es möglich dass in diesem halophilen Bakterium der Ectoin-Abbauweg zur Feinabstimmung zwischen interner und externer Osmolarität genutzt wird (128). *Halorhodospira halochloris*, der Organismus in dem Ectoin zu erst beschrieben wurde (4), kann seinen internen Ectoin-Pool abbauen und diesen durch Trehalose ersetzen, um Stickstoff für das Zellwachstum freizusetzen, wenn der externe Stickstofflevel niedrig ist (113). In *Chromohalobacter salexigens* können Ectoin und 5-Hydroxyectoin nur unter optimalen Osmolaritäten abgebaut werden. Eine erhöhte Osmolarität des Mediums führt zu einer Repression der katabolen Gene, ein Vorgang, welcher möglicherweise die Akkumulation der kompatiblen Solute begünstigt (274). In *Pseudomonas putida*, wie in *R. pomeroyi* DSS-3 auch, können Ectoin und 5-Hydroxyectoin katabolisiert, aber nicht als osmotische Schutzsubstanz genutzt werden (123). Der effiziente Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin als reine Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle ist eine Anpassungen von *R. pomeroyi* DSS-3 an das nährstoffarme marine Ökosystem.

## 5.2 Der 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus

### 5.2.1 Die Funktion der Genprodukte des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf*-Operons aus *R. pomeroyi* DSS-3

Aufbauend auf den Vorschlägen der bereits publizierten Mechanismen für den Abbau von Ectoin zu L-Aspartat (124,128), wurde ein Stoffwechselweg für den Katabolismus von sowohl 5-Hydroxyectoin, als auch Ectoin in *R. pomeroyi* DSS-3 vorgeschlagen [persönliche Kommunikation J. Heider; in (15); Abb. 3]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener chromosomaler Deletionen innerhalb des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-ssd-atf*-Operons auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 auf Ectoin und 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle getestet.

#### 5.2.1.1 Das *eutABC*-Gencluster

Dieser postulierte Stoffwechselweg beschreibt zum ersten mal die Umwandlung von 5-(S)-Hydroxyectoin zu Ectoin über eine Enzymkaskade der 5-(S)-Hydroxyectoin-Racemase (EutA), der 5-(R)-Hydroxyectoin-Dehydratase (EutB) und der Ectoin-Dehydrogenase (EutC) (Abb. 3). Im wesentlichen folgt dieser Mechanismus den gleichen Prinzipien, die zuvor in z.B. der Synthese von Fettsäuren beschrieben wurden (144,313). Den Erwartungen entsprechend, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *eutABC*-Gene des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons von *R. pomeroyi* DSS-3 tatsächlich für den Abbau von 5-Hydroxyectoin verantwortlich sind, aber keinen Einfluss auf den Katabolismus von Ectoin haben. Eine chromosomale Deletion der *eutABC*-Gene führte zu einem negativen Wachstumsphänotyp für jene *R. pomeroyi*-Kulturen, deren Medium 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zugesetzt wurde, nicht jedoch wenn Ectoin im Medium vorlag (Abb.12 D). Auch in *H. elongata* hat eine Deletion der homologen *eutBC*-Gene keinen Einfluss auf das Wachstum auf Ectoin (128). Im Kontrast dazu stehen die Untersuchungsergebnisse für *S. meliloti*, denen zufolge ein Stamm in dem das *eutA*-Gen deletiert wurde, ein deutlich schlechteres Wachstum auf einem Minimalmedium mit Ectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zeigt, als der entsprechende Wildtypstamm (124). Dies und die Tatsache, dass unter den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 539 putativen 5-Hydroxyectoin- und Ectoin-abbauenden Bakterienstämmen 240 Spezies sind, die nur die *eutBC*-Gene besitzen, nicht aber *eutA*, spricht möglicherweise dafür, dass es neben dem in Abbildung 3 aufgezeigten Abbauweg, weitere Wege existieren, um den Katabolismus von 5-Hydroxyectoin zu gewährleisten. Zusätzlich gibt es unter den 539 untersuchten katabolen Genclustern 71, die keine *eut(A)BC*-Gene aufweisen (Abb. 35). Ob diese Spezies nicht in der Lage sind 5-Hydroxyectoin zu katabolisieren, oder ob sie dies

über einen weiteren Stoffwechselweg erzielen, ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 5.2.1.2 Die Ectoin-Hydrolase EutD

Sowohl in dem für *H. elongata* als auch in dem für *R. pomeroyi* DSS-3 vorgeschlagenen katabolen Stoffwechselweg für (5-Hydroxy-)Ectoin stellt die Ectoinhydrolase (EutD) das Schlüsselenzym dar (15,128). Aus dem Medium aufgenommenes und durch die Dehydroxylierung von 5-Hydroxyectoin entstandenes Ectoin wird gleichermaßen durch die enzymatische Aktivität von EutD hydrolysiert und so die heteroaliphatische Verbindung N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat ( $\alpha$ -ADABA) gebildet (Abb. 3). Die Hydrolyse von Ectoin durch das heterolog in *E. coli* exprimierte EutD/DoeA-Enzym von *H. elongata* führte zu einer Akkumulation von sowohl  $\alpha$ -ADABA als auch des entsprechenden N $\gamma$ -Isomers in einem Verhältnis von 2:1 (128). Im gleichen Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass das in der Kaskade folgende Enzym EutE/DoeB in *H. elongata* spezifisch für das N $\alpha$ -Isomer dieser Verbindung ist (128). Da *H. elongata* neben der Fähigkeit zum Ectoin-Katabolismus auch die der Synthese des Aminosäurederivats besitzt, ist es nicht auszuschließen, dass  $\alpha$ -ADABA dem weiteren Abbau zu L-Aspartat durch die Enzyme EutD-Atf-Ssd (DoeBCD) zugeführt wird und  $\gamma$ -ADABA zurück in die Ectoinsynthese durch EctC fließen kann (74,91). Die Hydrolyse von Ectoin zu  $\gamma$ -ADABA würde für Organismen wie *R. pomeroyi* DSS-3, die nicht in der Lage sind Ectoin zu synthetisieren, möglicherweise in so genannten 'dead end'-Produkten resultieren, die entweder in der Zelle akkumulieren oder über spezifische Transporter exportiert werden müssten und so nicht zur Energiegewinnung beitragen würden (314). Die Enzyme EutD und EutE (Abb. 2) sind demzufolge essentiell für den Katabolismus von Ectoin und der damit verbundenen Nutzung dieser heterocyclischen Kohlenwasserstoffverbindung als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Eine Deletion von *eutD* kann nicht durch die unspezifische Aktivität anderer homologer Creatinasen oder Xaa-Proteptidasen ausgeglichen werden und führt in *R. pomeroyi* DSS-3 zu einem Verlust der Fähigkeit auf ausschließlich Ectoin und 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen (Abb. 12 E).

Das *eutD*-Gen kodiert für ein Protein von 395 aa Länge und gehört bioinformatischen Studien zu folge zu der M24-Peptidase Enzymfamilie. Innerhalb dieser Gruppe weist es die größte Ähnlichkeit zu den Creatinasen auf. Jede monomere Untereinheit dieses Proteins besteht dabei aus einer kleineren N-terminalen Domäne und einer größeren C-terminalen Domäne, die die 'pita-bread'-Faltung einnehmen (315,316). Erste biochemische Untersuchungen zeigten, dass EutD, wie andere homologe Creatinasen auch, in Lösung Dimere bildet (Daten nicht gezeigt). Die geringe heterologe Expression des codon-

optimierten EutD-Proteins in *E. coli*, erschwert jedoch die biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydrolase.

### 5.2.1.3 Die enzymatische Umwandlung von 2,4-Diaminobutyrat zu L-Aspartat durch Atf und Ssd

Eine gemeinsame Deletion von *ssd* und *atf*, den letzten beiden Gene des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons (Abb. 2), hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Abb. 12 F). Die Substrate beider Enzyme (2,4-Diaminobutyrat und L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd) kommen im allgemeinen bakteriellen Aminosäuremetabolismus häufig. Daher kann deren Umwandlung auch durch andere Enzyme gewährleistet werden, die im allgemeinen Stoffwechsel des zellulären Metabolismus vorkommen (Tab. 1).

**Tabelle 1: Beispielhafte Darstellung alternativer Stoffwechselwege für die Intermediate des Ectoinabbaus 2,4-Diaminobutyrat und L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd**

Enzym	enzymatische Reaktion	Stoffwechselweg	Quelle
L-2,4-Diaminobutyrat: Pyruvat-Aminotransferase	<b>L-2,4-Diaminobutyrat</b> + Pyruvat $\leftrightarrow$ L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd + Alanin	Asp-, Ala- Metabolismus	(317)
L-2,4-Diaminobutyrat- Carboxylase	<b>L-2,4-Diaminobutyrat</b> $\leftrightarrow$ L-1,3-Diaminopropan + CO <sub>2</sub>	Arg-Metabolismus	(318)
L-2,4-Diaminobutyrat: 2-Oxoglutarat- Transaminase	Glutamat + <b>L-Aspartat-<math>\beta</math>- Semialdehyd</b> $\leftrightarrow$ $\alpha$ -Ketoglutarat + L-2,4- Diaminobutyrat	Gly-, Ser-, Thr- Metabolismus	(319)
Homoserin- Dehydrogenase	<b>L-Aspartat-<math>\beta</math>-Semialdehyd</b> + NADH $\leftrightarrow$ Homoserin + NAD <sup>+</sup>	Thr-, Ile-, Met- Metabolismus	(320)

In der Tabelle sind beispielhaft die Enzyme aufgeführt, die L-2,4-Diaminobutyrat und L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd als Substrate nutzen und daher als Alternative zu Ssd bzw. Atf fungieren könnten. Alle Aminosäuren können dem allgemeinen Stoffwechsel zugeführt werden.

Da alle Aminosäuren dem generellen Stoffwechsel, meistens auf Höhe des Zitronensäurezyklus zugeführt werden können (144), wird dadurch nicht verhindert, dass Ectoin und 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden. Es scheint daher nicht verwunderlich, dass eine Reihe der gefundenen 539 putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucuster keine Homologe zu *ssd* und *atf* kodieren (Abb. 35). Diese Daten stehen jedoch im Gegensatz zu den *ssd/doeC*- und *atf/doeD*-Deletionen in *H. elongata*. In dem halophilen Organismus führen beide Deletionen unabhängig voneinander zu einem Phänotyp, der ein reduziertes Wachstum auf Ectoin aufweist. Eine chromosomale *atf/doeD*-Deletion führte zu einem deutlich verminderten Wachstum von *H. elongata* auf Ectoin als Kohlenstoffquelle. Eine *ssd/doeC*-Deletion hingegen hatte die Fähigkeit verloren Ectoin als Kohlenstoffquelle zu nutzen, konnte das Aminosäurederivat aber weiterhin als Stickstoffquelle verwenden (128).

#### 5.2.1.4 Die Aufnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin in das Cytoplasma

Ozeanwasser hat einen Salzgehalt von etwa 35 o/oo (parts per thousand). Davon fallen alleine rund 30 % auf Natriumionen (321). Der durchschnittliche Salzgehalt von Süßwasser und Erde liegt dabei nur bei etwa 1-3 o/oo und damit deutlich unter dem des Salzwassers in den Ozeanen. Da die Translokation von Substraten über die Zellmembran mittels eines TRAP-Transporters in den meisten Fällen Na<sup>+</sup>-abhängig ist, sind diese häufig in marinen Mikroorganismen zu finden (184). Es verwundert daher nicht, dass alle 48 UehA-Typ TRAP-Transporter, die innerhalb der Gencluster der 539 putativen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Abbauer gefunden wurden, von marinen Bakterien kodiert werden (Abb. 35). Im Gegensatz dazu kodieren die meisten, im terrestrischen- oder Süßwasserhabitat vorkommenden, Ectoin/5-Hydroxyectoin-abbauenden Bakterien, des hier gezeigten phylogenetischen Baumes (Abb. 35), für einen EhuABCD-Typ ABC-Transporter (370 von 539). Dieser Typ Transporter ist in fast allen Vertretern (zwei Ausnahmen) der Untergruppen P, A und R konserviert und deutet auf eine evolutionäre Anpassung an das terrestrische Habitat hin (Abb. 35). Die Spezifität der Ectoin/5-Hydroxyectoin-Aufnahme ist jedoch von der Transporterklasse unabhängig und wird ausschließlich von der Spezifität des Substratbindeproteins bestimmt (133,179). Die Ectoin/5-Hydroxyectoin-spezifischen Substratbindeproteine der Transporter aus *S. meliloti* (EhuABCD ABC-Transporter) (Abb. A6) und *R. pomeroyi* DSS-3 (UehABC TRAP-Transporter) (Abb. A7) sind bereits gut charakterisiert und binden ihre jeweiligen Substrate im niedrigen mikromolaren Bereich (125,127). Zusätzlich zu den 48 Spezies, die innerhalb des untersuchten Genclusters für einen UehA-Typ TRAP-Transporter kodierten, konnten auch 23 bakterielle Spezies gefunden werden, bei denen an anderer Stelle im Genom für einen TeaA-Typ

TRAP-Transporter kodiert wurde (Abb. 35 und A8). Wie auch der UehA-Typ ist der TeaA-Typ dieser Transportergruppe spezifisch für Ectoin und 5-Hydroxyectoin, ist aber im Gegensatz zu ersterem osmotisch induziert und dient unter anderem der Wiederaufnahme von Ectoinen, die aus der Zelle diffundieren. (127,189,190). Interessanterweise sind jene Organismen des phylogenetischen Baumes, die einen TeaA-Typ TRAP-Transporter besitzen, ebenfalls in der Lage Ectoin oder 5-Hydroxyectoin zu synthetisieren (Abb. 35). Möglicherweise dient diesen Mikroorganismen, wie bereits für *H. elongata* vermutet, der Ectoin-Abbaupfad nicht alleinig zur Gewinnung von Nährstoffen, sondern zur Feinabstimmung des internen osmotischen Drucks im Vergleich zu dem des externen Mediums (128).

### **5.2.1.5 Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Synthese in Organismen die Ectoine katabolisieren**

Insgesamt konnten auf Grundlage des Vorhandenseins des *ectABC*-Genclusters 100 putative Organismen ausgemacht werden, die nicht nur Ectoin/5-Hydroxyectoin katabolisieren können, sondern auch zur Synthese von Ectoin befähigt sein sollten (74,91) (Abb. 1). Von diesen 100 Stämmen besitzen 33 auch ein *ectD*-Gen und sollten daher in der Lage sein 5-Hydroxyectoin zu synthetisieren (6,94). Manche Bakterien können ihren eigenen internen Pool an akkumulierten kompatiblen Soluten nach Abklingen des osmotischen Stress wieder dem generellen Stoffwechsel zuführen und zur Energiegewinnung nutzen. Dies ist zum Beispiel für die Verwendung von GB durch das Corynebakterium *Aphanthece halophytica* bekannt (112). Es sind aber auch Beispiele beschrieben, z.B. die Verwendung von Trehalose in *E. coli*, nach dem Mikroorganismen ein endogen synthetisiertes kompatibles Solut als Schutzsubstanz gegen osmotischen Stress nutzen, aber die gleiche Substanz aus exogenen Quellen ausschließlich dem Katabolismus zuführen und diese als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle nutzen. Sie besitzen daher zwei unabhängige Stoffwechselwege für die Synthese und die Degradation der gleichen Substanz, die aber unterschiedlich reguliert werden (322).

### **5.2.2 Die phylogenetische Verteilung und die genetische Anordnung der Gene des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus**

Die hier untersuchten Aminosäurederivate werden von Mitgliedern von 14 bakteriellen und archaealen Phyla als Antwort auf osmotischen Stress synthetisiert (6,7,74) und kommen daher in hoher Abundanz in den entsprechenden Wachstumsmedien vor (87,323). Vor allem in marinen Habitaten ist die hinreichende Versorgung mit Stickstoff ein limitierender Wachstumsfaktor. Ectoine enthalten zwei Stickstoffatome (Abb. 1) und sind daher eine

wertvolle Stickstoffquelle. Die hier durchgeführten *in silico* Analysen der taxonomischen Verbreitung der Fähigkeiten zum 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Katabolismus zeigen, dass es sich um einen Stoffwechselweg handelt, der in dieser Art ausschließlich in *Proteobacteria* vorhanden ist (Abb. 35). Zu der häufigsten Untergruppe innerhalb der 539 gefundenen putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Konsumenten gehören die *Alphaproteobacteria*, zu denen auch der hier untersuchte Modelorganismus *R. pomeroyi* DSS-3 zählt. Überraschend ist die hohe Diversität der genetischen Nachbarschaft in der die katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gene in den untersuchten Organismen vorliegen (Abb. 34). Dies steht im starken Gegensatz zu der hohen Konservierung der *ectABC(D)*-Gene der Ectoin/5-Hydroxyectoin-Synthese (6,7). Die Anordnung von Genen innerhalb eines Operons ist im Allgemeinen eine labile Charakteristik von bakteriellen Genomen. Je höher die Verwandtschaft zwischen zwei Spezies ist, desto wahrscheinlicher ist die Konservierung der Anordnung der Gene in einem gleichen Operon (324,325). Dies wird auch in dem hier gezeigten Beispiel deutlich. Die unmittelbar verwandten *Rhizobium*- und *Sinorhizobium*-Stämme im phylogenetischen Baum (Abb. 35), besitzen mit wenigen Ausnahmen die gleichen Gene für den Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin und die gleiche Anordnung dieser (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu weisen die Vertreter der M3-Untergruppe des phylogenetischen Baumes (Abb. 35) eine höhere taxonomische Distanz zueinander auf. Damit korrelierend, ist auch eine stärkere Variation in den Genen für den Katabolismus von Ectoinen und deren Organisation innerhalb der Operons zu verzeichnen (Abb. 35). Es ist hervorzuheben, dass bestimmte Genpaare jedoch stets in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Dies wird neben den Transportergenen besonders für die *eut(A)BC*-Gene und das *eutDE*-Genpaar deutlich. In keinem der gefundenen Gencluster werden diese in ihrer gezeigten Anordnung getrennt (Abb. 34). Erklärungen für die evolutionäre Konservierung dieser Genpaare können entweder in der möglichen Interaktion der entsprechenden Proteine in Form von 'substrate channeling' (326) oder in der Erleichterung des lateralen Gentransfers von funktionellen Einheiten (327) gefunden werden.

### 5.2.3 Genomische Duplikationen der katabolen Gencluster

Interessanterweise besitzen sieben der gefundenen putativen 539 Ectoin/5-Hydroxyectoin-abbauenden bakteriellen Spezies mehr als ein kataboles Ectoin/5-Hydroxyectoin-Operon. Insbesondere interessant sind dabei die drei Stämme (*Mesorhizobium loti* NZP2037, *Pseudomonas putida* KT2440 und *Mesorhizobium loti* MAFF303099), die nicht nur eine reine Duplikation des Genclusters in ihrem Genom beherbergten, sondern ein weiteres Gencluster enthielten, dass im Aufbau und der Aminosäuresequenz des EutD-Gens andersartig war. Im allgemeinen ist das Phänomen der vermeintlich 'überflüssigen'



Genduplikation noch nicht vollständig erforscht. In einigen Theorien zu diesem Thema wird von 'neutralen', also wirkungslosen, Mutationen ausgegangen (328). Es gibt aber auch eine Reihe von Beispielen, nach denen eine zweite Kopie eines oder mehrerer Gene im bakteriellen Genom, die Fitness des Organismus erhöht. Der Mechanismus dahinter ist aber nur wenig verstanden (328). Es wird vermutet, dass eine erhöhte Genzahl auch zu einer erhöhten Kopienzahl der Genprodukte führt und somit die designierte Funktion mit höherer Effektivität ausführen kann (329–331). Ein anderes Konzept geht von einer fortlaufenden Evolution eines der beiden Kopien aus, um eine Adaptation an unterschiedliche Gegebenheiten und Umwelteinflüsse zu ermöglichen (332,333). Letzteres muss auch unter dem Aspekt betrachtet werden, dass das die Verdopplung eines Gens in einem Chromosom nicht die Folge von internen Duplikationen sein muss, sondern auch das Resultat von zwei horizontalen Gentransfers durch verwandte oder nicht verwandte Spezies sein kann und dadurch von vorneherein andere Funktionen ausführen können (334). Es ist durchaus möglich, dass die gefundenen Gencluster mit vermeintlich ähnlicher Funktion, auf eine andere Art und Weise reguliert werden und so eine Anpassungsstrategie an veränderliche Umwelteinflüsse ermöglicht. Es ist zum Beispiel denkbar, dass ein Gencluster einen salzinduzierten Katabolismus von Ectoinen vermittelt, wie für *H. elongata* beschrieben (128) und das andere einen substratinduzierten Katabolismus ermöglicht (15,124).

Es muss angemerkt werden, dass die vermutete Anwesenheit eines zweiten katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Genclusters in *S. meliloti*, nicht bestätigt werden konnte (124). Unter Beachtung der in dieser Arbeit zugrunde gelegten Kriterien besitzt *S. meliloti* nur ein *eutD*-abhängiges Gencluster für den Ectoin-Katabolismus.

Dies, im Zusammenhang mit der Feststellung, dass vor allem in den Untergruppen B und R zusätzliche Gene kodiert werden, die in den Genclustern von *R. pomeroyi* DSS-3, *S. meliloti* und *H. elongata* nicht gefunden werden können (Abb. 35), sowie weitere in den vorherigen Abschnitten erläuterten Beobachtungen, sprechen dafür, dass die evolutionäre Entwicklung des katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Genclusters noch nicht abgeschlossen ist und dass möglicherweise auch Stoffwechselwege für den Katabolismus von Ectoin und/oder 5-Hydroxyectoin existieren, die sich von dem hier beschriebenen unterscheiden.

### 5.3 Analysen zur transkriptionellen Regulation des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons von *R. pomeroyi* DSS-3

Mikroorganismen, die in der Lage sind Ectoin und 5-Hydroxyectoin zu produzieren, kommen sowohl im terrestrischen und marinen, als auch pflanzenassoziierten Habitaten vor (6,7). Die gleiche Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit für potentielle Ectoin/5-Hydroxyectoin-katabolisierende Organismen gemacht werden (Abb. 35). Da diese Aminosäurederivate jedoch primär die Funktion einer osmotischen Schutzsubstanz erfüllen, liegen sie nicht zu jedem gegebenen Zeitpunkt in einem entsprechenden Habitat vor und Mikroorganismen müssen in der Lage sein, ihr metabolisches Programm so umzustellen, dass die Verwendung alternativer Nährstoffquellen ermöglicht wird. Für *S. meliloti* konnte bereits gezeigt werden, dass diese Anpassung über die Erhöhung der Enzymkonzentrationen der entsprechenden katabolen Gene erfolgt (124).

#### 5.3.1 Nur der Promotor vor *uehA* ist substratinduzierbar

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von 'Northern Dot Blot'-Analysen die Erhöhung der Transkriptmenge bestimmter Gene des katabolen *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons von *R. pomeroyi* DSS-3 untersucht (Abb. 11). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expressionslevel des *enuR*-Gens nicht durch die Anwesenheit der Substrate Ectoin und 5-Hydroxyectoin moduliert werden kann, obwohl dieses in einem Operon mit dem stromabwärts gelegenen *uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Gencluster liegt [persönliche Kommunikation N. Stöveken; in (15)] (Abb. 2). Eine Reportergenfusion des putativen Promotorbereiches vor *enuR* zeigte ebenfalls keine substratabhängige Induktion der Transkription (Abb. 15). Die Expression des *enuR*-Gens ausgehend von dem davor liegenden Promotor und damit verbunden möglicherweise aller stromabwärtsgelegener Gene des katabolen Operons, erfolgt auf einem Basallevel unter den getesteten Bedingungen (Abb. 15 und 16). Im Gegensatz dazu zeigen alle im 'Dot Blot' getesteten katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Gene eine substratabhängige Induktion der Transkription, wenn Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoffquelle im Medium vorliegen (Abb. 11). Die Analyse der Induktion der Transkription von dem Promotor vor *uehA* unter induzierenden Bedingungen mittels Reportergenfusion zeigte, dass die Expression des *uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Genclusters um das 30-fache (Ectoin) bzw. das 64-fache (5-Hydroxyectoin) erhöht wird (Abb. 15). Noch stärker steigt das Expressionslevel von  $P_{uehA}$ , wenn beide beschriebene Promotoren und das gesamte *enuR*-Gen auf der Reportergenfusion kodiert sind (36-fach bei Wachstum auf Ectoin und 100-fach für 5-Hydroxyectoin) (Abb. 15). Dies könnte zwei unterschiedliche Ursachen haben; (i) entweder erfolgt durch die Kodierung des vollständigen *enuR*-Gens auf der *lacZ*-Fusion eine

Überexpression eines Aktivators des Operons oder (ii) durch die Verkürzung des DNA-Fragments auf der Reporterengenfusion wurden wichtige regulatorische Bereiche entfernt, die die vollständige Aktivierung des Promotors verhindern. Da es sich um das Letztere handelt, konnte gezeigt werden, indem das untersuchte DNA-Fragment der  $P_{uehA}$ -Reporterengenfusion von 433 bp auf 1000 bp verlängert wurde. Diese Fusion enthält weiterhin kein vollständiges *enuR*-Gen und schließt damit eine regulatorische Funktion des plasmidbasierten *enuR*-Genprodukts aus. Dennoch konnte wieder eine 36-fach Induktion der Transkription bei Wachstum auf Ectoin und 100-fache Induktion bei Anwesenheit von 5-Hydroxyectoin gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das DNA-Fragment vor *uehA* länger als 433 bp sein muss, um die vollständige Aktivierung der Transkription der stromabwärtsgelegenen Gene zu ermöglichen.

Transkriptionsfaktoren metabolischer Systeme binden meist das Substrat oder das Produkt des jeweiligen Stoffwechselweges als Effektor, wodurch die Affinität des Regulatorproteins zu dessen DNA-Zielsequenz verändert wird. Nicht selten beruht dies auf Effekten der Allosterie und ermöglicht so eine schnelle Antwort auf Umweltreize. Allosterie ist als Prozess definiert, bei dem die Aktivität eines Proteins durch einen Effektor beeinflusst wird, der außerhalb des eigentlichen aktiven Teils des Proteins, z. B. außerhalb der DNA-Bindedomäne, bindet (335). Die Induktion der Transkription ausgehend von dem Promotor vor *uehA* erfolgt sowohl bei Anwesenheit von Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin im jeweiligen Wachstumsmedium. Dennoch ist die Aktivierung durch 5-Hydroxyectoin etwa 2,5-mal so stark, wie die durch Ectoin. Eine solche ungleiche Abhängigkeit von zwei verschiedenen Effektormolekülen, wurde zuvor bereits für den LysR-Typ Regulator, BenM, aus *Acinetobacter baylyi* beschrieben. Der Transkriptionsaktivator BenM ist verantwortlich für den Katabolismus verschiedener aromatischer Verbindungen und erhöht die Transkription der entsprechenden Gene bei Anwesenheit von sowohl Muconat als auch Benzoat. Dabei ist die Aktivierung durch Muconat größer, als die durch Benzoat. Da beide Substrate in verschiedenen Bindetaschen im Regulatorprotein gebunden werden, konnte zusätzlich ein synergetischer Effekt auf die Aktivierung der Transkription beobachtet werden, wenn beide Substrate gleichzeitig im Medium vorlagen (336,337).

### 5.3.2 Der Einfluss von EnuR auf $P_{uehA}$

Die nicht substratinduzierbare Co-Transkription des *enuR*-Gens mit den Genen der Ectoin/5-Hydroxyectoin-Aufnahme und des Katabolismus in einem Operon (15) und die Tatsache, dass 456 der untersuchten 539 katabolen (5-Hydroxy-)Ectoin-Gencluster für einen solchen Regulator kodierten, lässt eine wichtige regulatorische Funktion von EnuR

vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine chromosomale Deletion des *enuR*-Gens keinen Einfluss auf das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 mit sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle hat (Abb. 12 C). Die anschließenden Reportergermanalysen identifizierten EnuR als Repressor für den Promotor vor *uehA*, wenn die Substrate nicht im Medium vorliegen, da eine Deletion des *enuR*-Gens zu einer konstitutiven Aktivität des  $P_{uehA}$  führte (Abb. 18). Gleichermäßen konnte aber auch ein Rückgang der Induktion der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  um etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, wenn Ectoin oder 5-Hydroxyectoin im Wachstumsmedium vorlagen (Abb. 18). Dies deutet auf eine Funktion von EnuR sowohl als Repressor unter nicht-induzierenden Bedingungen, als auch als Aktivator bei Substratanwesenheit hin. In bakteriellen Systemen sind solche Repressor/Aktivator-Transkriptionsregulatoren, die sich eines so genannten "Lichtschalter"-Mechanismus (338) bedienen, bereits beschrieben und verschiedene Mechanismen bekannt. Diese Art der Regulation kann zum Beispiel konzentrationsabhängig erfolgen. Der sporulationsspezifische Transkriptionsfaktor GerE aus *B. subtilis* aktiviert, wenn dieser in niedrigen Konzentrationen vorhanden ist, die Expression von *cotD*, wirkt aber als Repressor auf das gleiche Gen, wenn die zelluläre Konzentration von GerE über einen bestimmten Schwellenwert steigt (339). Diese Art des "Lichtschalter"-Mechanismus ist für EnuR auszuschließen, da die Expression des  $P_{enuR}$  nicht induzierbar ist (Abb. 11 und 15) und die Konzentration von EnuR in der Zelle daher vermutlich nur minimal schwanken wird. Die zweite bekannte Form des Repressor-Aktivator-Schalters beruht auf der Wahrnehmung eines bestimmten Signals/Umweltreizes durch einen Repressor, was zu einer spezifischen strukturellen Veränderung der Signalausgabedomäne führt. Diese induziert dann nicht nur die Derepression des Gens oder Genclusters, sondern auch dessen Aktivierung durch eine Veränderung der DNA-Topologie (340–342). Der CueR-Regulator aus *E. coli* ist verantwortlich für die Metall-Homöostase und bindet kleine metallische Liganden als Cofaktoren. Die Aktivierung und Repression der Gene ausgehend von der gleichen DNA-Bindestelle erfolgt dabei über die Veränderung der lokalen DNA-Struktur innerhalb des Promotors. Im reprimierten Zustand wird die DNA so gebogen, dass eine Interaktion mit der RNA-Polymerase nicht möglich ist. Durch die allosterische Bindung des Liganden geht CueR in die Aktivatorkonformation über, ohne jedoch die DNA-Bindestelle zu verlassen. Die DNA wird in die A-Form gezwungen und begünstigt so die Interaktion und Bildung des offenen Komplexes mit der RNA-Polymerase (342). Die Veränderung der DNA-Topologie durch die Konformationsänderung eines Transkriptionsfaktors ist auch für die Regulation des katabolen Arabinose-Operons in *E. coli* durch den Regulator AraC bekannt (338). Alle bisher untersuchten MocR/GabR-Typ Transkriptionsregulatoren sind Aktivatoren für ihre in *cis*-liegenden Gene und Autorepressoren für ihre eigenen Strukturgene (223–227,343,344).

EnuR ist der erste beschriebene Repressor seiner Gruppe und bedient sich möglicherweise des "Lichtschalter"-Mechanismus um die Transkription des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Operons ebenfalls zu aktivieren.

### 5.3.3 Das Regulatorprotein EnuR

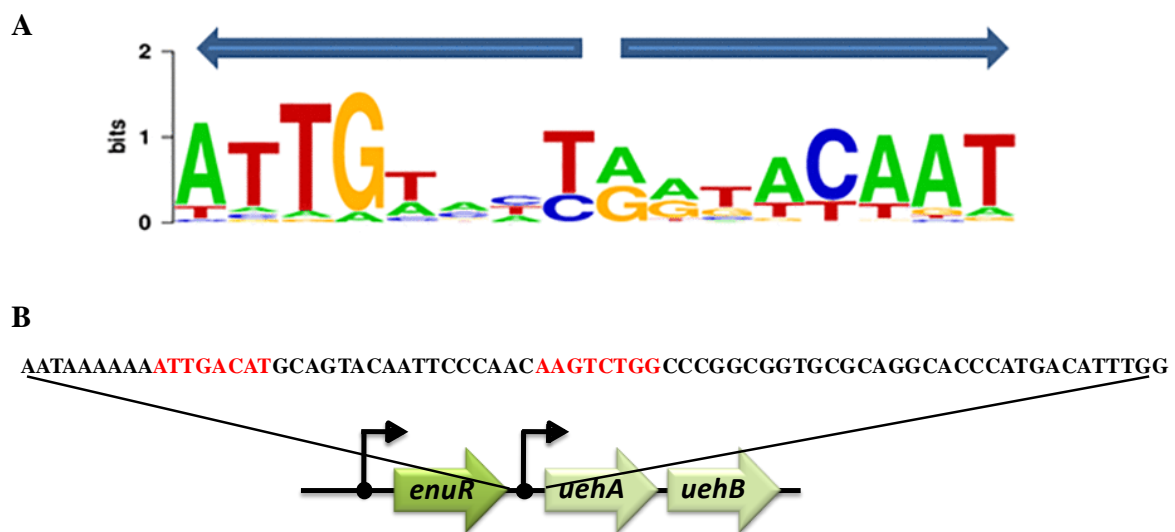
Ein *in silico* Model des Regulatorproteins EnuR klassifiziert diesen auf Grund seiner N-terminalen winged-helix-turn-helix (wHTH) DNA-Bindedomäne der GntR-Superfamilie der Transkriptionsregulatoren zugehörig (126,212). Die etwa 350 Aminosäure-lange C-terminale Domäne weist eine Faltung gleich der, der Aminotransferasen der Klasse I auf, und ermöglicht daher die Einordnung von EnuR in die MocR/GabR-Untergruppe der GntR-Transkriptionsregulatoren (126,219,222,228,345). Wie auch in vielen anderen MocR-Typ Regulatoren auch sind die Aminosäuren für die Koordinierung des Pyridoxal-5'-Phosphat-Cofaktors in diesem Vertreter der Untergruppe konserviert (219,222) (Abb. A9). Darunter befindet sich auch, das, für PLP-bindende Enzyme charakteristische, Lysin (Lys-302), welches die kovalente Bindung des Cofaktors über die Bildung einer internen Schiff'schen Base ermöglicht (Abb. 37). Die heterologe Überproduktion in *E. coli* und die chromatographische Reinigung des Wildtyp-EnuR führte zu einer gelben Proteinlösung (Abb. 20). Hierbei handelt es sich um ein Charakteristikum von PLP-bindenden Proteinen (281), da der Cofaktor eine chromophore Verbindung darstellt und elektromagnetische Strahlung absorbiert. Durch UV/Vis-Spektroskopie konnten die typischen Absorptionsbanden des PLP bei 330 und 420 nm (282) nachgewiesen werden. PLP-bindende Proteine absorbieren daher Licht im sichtbaren Bereich (420 nm; violett) und erscheinen dem menschlichen Auge gelb. Über die gerichtete Mutagenese des Lysins-302 zu einem Histidin, wurde die primäre  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins eliminiert und somit auch die Möglichkeit PLP kovalent zu binden, verhindert. Eine chromatographische Reinigung des mutierten Proteins (EnuR\*) führte zu einer farblosen Proteinlösung (Abb. 20). Im UV/Vis-Spektrum waren die charakteristischen PLP-Absorptionsmaxima nicht mehr nachweisbar. Die massenspektrometrischen Untersuchungen von EnuR und EnuR\* konnten die Bindung der prosthetische Gruppe im Wildtypprotein und dessen Verlust in der Lys-302/His-Mutante ebenfalls eindeutig nachweisen (Abb. 21 und 22). Dass der Verlust des Cofaktors nicht einfach auf einen Verlust der korrekten Proteinfaltung zurückzuführen ist, wurde mittels CD-Spektroskopie und Größenausschlußchromatographie untersucht. Das *in silico* Model von EnuR zeigt eine aus  $\alpha$ -Helices aufgebaute Sekundärstruktur, die nur von wenigen kurzen  $\beta$ -Faltblättern unterbrochen wird (Abb. 19). Auch Aminotransferasen der Klasse I, wie LysN aus *T. thermophilus* (PDB ID: 2EGY) oder AspC aus *E. coli* (PDB ID: 1ART) bestehen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices. Die aufgenommenen CD-Spektren für EnuR und EnuR\*

bestätigen dies. Die Peptidketten liegen vollständig gefaltet vor und besitzen keine unstrukturierten Domänen. Die Absorptionsminima 208 und 222 nm weisen auf eine größere Anzahl  $\alpha$ -Helices als  $\beta$ -Faltblätter hin. Alle bisher untersuchten MocR/GabR-Typ Transkriptionsregulatoren weisen eine dimere Quarternärstruktur auf, die aus Homodimeren gebildet wird (224,226,229,231). Größenausschlusschromatographie-Analysen konnten dies auch für EnuR und die Lys-302/His-Mutante EnuR\* bestätigen. Die Bindung des PLP-Cofaktors beeinflusst daher weder die Faltung des Proteins, noch dessen Fähigkeit zur Ausbildung von Homodimeren (Abb. 24). Dies entspricht den Beobachtungen, die zuvor für GabR aus *B. subtilis* gemacht wurden. Diesen Studien entsprechend, ist die korrekte Faltung der C-terminalen Aminotransferasedomäne abhängig von der N-terminale WTH-Domäne, nicht aber von dem Cofaktor PLP (229,231).

In Untersuchungen der Funktion von EnuR\* *in vivo* konnte gezeigt werden, dass dieser die Aktivität des Promotors vor *uehA* sowohl bei Wachstum auf Ectoin, als auch auf 5-Hydroxyectoin auf ein Basalniveau senkt und nur eine sehr reduzierte Transkription der stromabwärtsliegenden Gene mehr erfolgt. Die prosthetische Gruppe des EnuR-Transkriptionsregulators ist somit essentiell für die Derepression der katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Gene unter induzierenden Bedingung. Der Verlust des Cofaktors führt interessanter Weise zu einer konstitutiven Repression des Promotors vor *uehA* (Abb. 29). Diese Beobachtung wurde durch eine *in vitro* DNA-Protein-Interaktionsstudie bestätigt. EnuR bindet ein DNA-Fragment vor *uehA* mit nur halb so hoher Affinität, wie sein PLP-freies Gegenstück EnuR\* (Abb. 27). Der Verlust des Cofaktors verhindert also nicht die Bindung des Repressors an seine spezifische Operatorsequenz stromaufwärts von *uehA*, beeinflusst aber die Affinität der beiden Interaktionspartner zueinander (Abb. 27). EnuR\* stellt daher eine Art Superrepressor dar, welcher durch die Abwesenheit der prosthetischen Gruppe mit hoher Affinität an seine Ziel-DNA bindet, sich von dieser aber nicht mehr lösen kann, da die Bindung des Induktors nicht mehr möglich ist (Abb. 25 und 29). Die Repression der Transkription von P<sub>*uehA*</sub> durch EnuR\* ist so stark, dass auch die aktivierenden Effekte durch AsnC und NtrX keinen Einfluss mehr nehmen können (Abb.29).

Der MocR-Typ Regulators GabR aus *B. subtilis* bildet ein 'domain-swap' Homodimer (Abb. 7). Die Bindungsenergie zwischen den beiden Aminotransferasedomänen ist dabei sehr hoch und deutet auf eine hohe Stabilität dieser Interaktion hin. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsenergie zwischen der WTH-Domäne des einen Monomers und der Aminotransferasedomäne der zweiten monomeren Untereinheit gering. Es wird davon ausgegangen, dass die quarternäre Struktur von GabR in Folge der Ligandenbindung große Konformationsänderung vollzieht. Die Bewegung der WTH-Domänen relativ zu dem

stabilen Aminotransferase-Dimer, begünstigt so die DNA-Bindung durch GabR an dessen spezifische Operatorsequenzen. Während das DNA-Bindemotiv von GabR bereits bekannt ist (227), konnte die putativen DNA-Bindestellen für EnuR-Typ Transkriptionsregulatoren ausschließlich im Rahmen von bioinformatischen Analysen ermittelt werden (345) (Abb. 36 A). Ein Sequenzvergleich der 233 bp stromaufwärts des *uehA*-Gens, in welchen EnuR entsprechend der Interaktionsstudien (Abb. 27) bindet, ergab, dass in *R. pomeroyi* DSS-3 ähnliche, wenn auch nicht vollständig konservierte, 'inverted repeats' existieren (Abb. 36 B). Im Gegensatz zu der Hypothese von Suvorova *et al.* (2016) folgen diese jedoch nicht unmittelbar aufeinander, sondern sind durch 16 bp getrennt. Dies entspricht einer Steigung von 1,5 Helices. In Verbindung mit der putativ flexiblen DNA-Bindedomäne von MocR/GabR-Typ Transkriptionsregulatoren ist dies möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors nur durch eine lokale Veränderung der DNA-Krümmung möglich ist. Dabei handelt es sich um eine Beobachtung, die zuvor auch schon für GabR beschrieben wurde (346).



**Abbildung 36: Die putative DNA-Bindesequenz von EnuR**

(A) Dargestellt ist die bioinformatisch ermittelte DNA-Bindesequenz für EnuR-Typ Proteine, welche von Suvorova *et al.* (2016) ermittelt wurde (345). (B) In der schematischen Darstellung der ersten Gene des katabolen Ectoin-Operons wurde die Sequenz des intergenen Bereiches zwischen *enuR* und *uehA* hervorgehoben. Innerhalb dieser Sequenz wurden die Konsensussequenzen der putativen DNA-Bindemotive rot markiert.

### 5.3.4 Analysen zum internen Induktor des EnuR-Transkriptionsfaktors

Unter den MocR/GabR-Typ Transkriptionsregulatoren ist der Aktivator der katabolen  $\gamma$ -Aminobutyrat-Operons (*gabTD*) -GabR- der am besten untersuchte (228,229,231). Für

GabR konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Anwesenheit des Cofaktors, sondern auch die des Substrats des Stoffwechselwegs (GABA) essentiell für die Aktivierung des *gabTD*-Operons sind (227,230). Wie in funktionellen Aminotransferase-Enzymen auch, wird sich die Fähigkeit des PLP zu Nutze gemacht, über dessen Aldehydgruppe primäre Aminogruppen zu binden (286,287) (Abb. 19 B und 37). Die Ausbildung eines externen Aldimins zwischen der Aminosäure GABA und dem PLP-Molekül bewirkt vermutlich eine Verschiebung der wHTH-Domänen des Dimers zu einander und so eine Veränderung der DNA-Bindungsaffinität (227,229,231).

Analog zu der beschriebenen Ligandenbindung in GabR, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator EnuR ebenfalls ein Aminosäurederivat mit einer primären Aminogruppe bindet (Abb. 25 und 30). N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat ist das Produkt der Ectoinhydrolyse durch EutD (Abb. 3) und das einzige stoffwechselwegspezifische Intermediat der Reaktionskaskade durch EutDE-Atf-Ssd. N $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat bindet *in vitro* mit einer hohen, spezifischen Affinität von 1,73 (+/- 0,73)  $\mu$ M an EnuR. Das Ny-Isomer dieses Aminosäurederivats und die Ausgangsstoffe des Stoffwechselwegs Ectoin und 5-Hydroxyectoin, zeigten keine Bindeaffinität gegenüber dem Transkriptionsfaktor (Abb. A4). Die chromosomale Deletion von *eutD* in *R. pomeroyi* DSS-3 verhindert, dass  $\alpha$ -ADABA in der Zelle gebildet wird. Eine Analyse der Aktivität des Promotors vor *uehA* in diesem genomischen Hintergrund zeigte, dass diese um das 2,5-fache im Gegensatz zum Wildtyp vermindert wird, wenn Ectoin als Substrat im Medium vorliegt (Abb. 30). Die Stärke der Transkription ausgehend von P<sub>*uehA*</sub> wird in diesem genomischen Kontext jedoch nicht beeinflusst, wenn 5-Hydroxyectoin im Medium vorliegt (Abb. 30). Da EutD aber das Schlüsselenzym des Katabolismus beider Substrate ist, führt eine Deletion des entsprechenden Gens nicht nur zu einem Verlust des Wachstum auf Ectoin, sondern auch auf 5-Hydroxyectoin (Abb. 12 D). Interessanter Weise zeigte eine genomische Deletion der 5-Hydroxyectoin-spezifischen *eutABC*-Gene ein umgekehrtes Expressionsmuster (Abb. 31). In diesem Fall ging die Transkription ausgehend von P<sub>*uehA*</sub> deutlich zurück auf etwa 10 % des Ausgangswertes im Wildtyp, wenn diesem Stamm 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt wurde. Die Anwesenheit von Ectoin hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors (Abb. 31). Diesen Ergebnissen zu folge wird die Transkription des Promotors vor *uehA* maßgeblich von dem PLP-abhängigen Transkriptionsfaktor EnuR beeinflusst, dieser scheint aber von zwei verschiedenen internen Induktoren abhängig zu sein. Die Bindung von  $\alpha$ -ADABA an EnuR wurde bereits *in vitro* gezeigt und hat auch *in vivo* einen Effekt auf die Transkription des Operons, wenn Ectoin als Substrat genutzt wird. Der interne Induktor, der für die Induktion der Transkription verantwortlich ist, wenn 5-Hydroxyectoin als Substrat vorliegt, wird durch



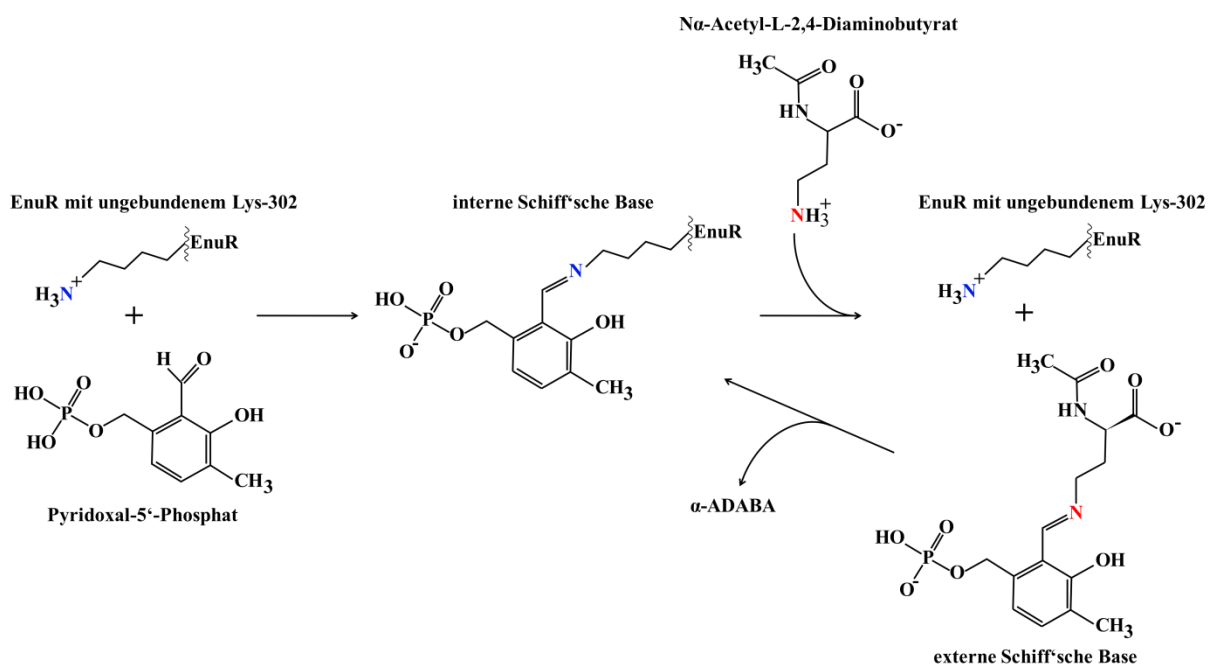
die Enzyme EutA, EutB und/oder EutC gebildet (Abb. 3 und 31). Dessen chemische Identität ist bisher unbekannt.

Die transkriptionelle Aktivierung von katabolen Genclustern durch die Bindung von Intermediaten des entsprechenden Stoffwechselwegs an Transkriptionsregulatoren, erlaubt nicht nur eine schnelle Antwort auf die Anwesenheit bestimmter Nährstoffe im Medium, sondern auch die Integration von Signalen der folgenden metabolischen Prozesse, welche meist in verschiedenen Geschwindigkeiten und mit Zeitverzögerungen im Vergleich zur initialen Substrataufnahme, auftreten (347). Die Voraussetzung für die Funktionsweise dieses Mechanismus ist ein konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher durch ein Stoffwechselintermediat aktiviert werden kann und die basale Aktivität von Transportern und Enzymen, um die Nährstoffanwesenheit zu signalisieren (348,349). Dieser Prozess erlaubt die dynamische Anpassung der Transkription der katabolen Gene an die tatsächliche Geschwindigkeit mit der das Substrat abgebaut wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt wird grundsätzlich von jenem Enzym ausgeführt, das das signalgebende Intermediat abbaut, sodass eine verstärkte Akkumulation des Signalmoleküls eine verstärkte Transkription der katabolen Gene bewirkt (349,350). Dieser Mechanismus stellt eine rückkoppelnde Signalübermittlung dar, welche es dem Organismus erlaubt, die Expression der Gene an den tatsächlichen Bedarf an aktiven Enzymen anzupassen, anstatt nur auf die reine Präsenz der Nahrungsquelle anzusprechen (350,351). Wie dieses signalgebende Intermediat gebildet wird, ist abhängig von den Anforderungen, die an das Signalmolekül gestellt werden und von den vorhandenen Stoffwechselenzymen. So ist zum Beispiel der Induktor des *lac*-Operons die Allolactose, welches ein Nebenprodukt der  $\beta$ -Galaktosidase-Reaktion ist und unabhängig vom eigentlichen Stoffwechselweg gebildet wird (352). Das *hut*-Operon hingegen ist in verschiedenen Bakterien verantwortlich für die Verwendung von Histidin als Nährstoff und erfährt transkriptionelle Aktivierung als Folge der Bindung von Urocanat, ein Intermediat des Stoffwechselwegs, an den Transkriptionsfaktor HutP (353).

Die Induktion der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$ , wenn Ectoin im Medium vorhanden ist, erfolgt also über die Bildung eines Induktors ( $\alpha$ -ADABA), welcher ein direktes Intermediat des Stoffwechselwegs ist (Abb. 3). Ein Mechanismus, der dem des oben beschriebenen *hut*-Operons entspricht (353). In dem vorliegenden Stoffwechselweg, ist nach dem beschriebenen Modell, EutE das geschwindigkeitsbestimmende Enzym. Bei einer basalen Transkription der Gene liegen zu wenige EutE-Enzyme in der Zelle vor um den Katabolismus schnell genug ablaufen zu lassen. Die daraus resultierende Erhöhung der zellulären Konzentration von  $\alpha$ -ADABA, bewirkt dessen Bindung an EnuR über die Ausbildung einer Schiff'schen Base mit dem in der Effektorbindedomäne enthaltenen PLP (Abb. 37). Analog zu den Studien mit GabR kann davon ausgegangen werden, dass diese

Reaktion vermutlich eine Konformationsänderung in der N-terminalen DNA-Bindedomäne von EnuR bewirkt und die damit verbundene Derepression und Aktivierung der Transkription der Transporter- und Katabolismogene ausgelöst wird. Wenn kein Ectoin mehr aufgenommen wird und damit die intrazelluläre Konzentration an  $\alpha$ -ADABA unter einen bestimmten Grenzwert fällt, wird die reversible externe Aldiminbindung gelöst und wieder durch das interne Schiff'sche Base ersetzt. EnuR geht in seine ursprüngliche Konformation über und reprimiert die Transkription der katabolen Gene.

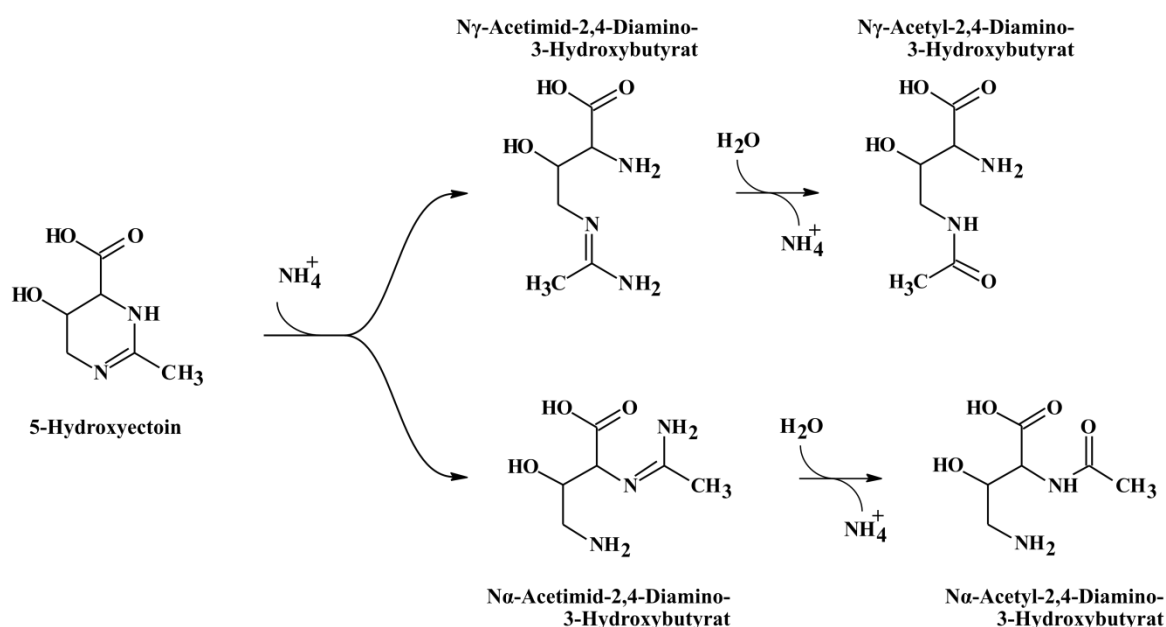
Es lässt sich dennoch nicht ausschließen, dass das Reaktionsprodukt der Deacetylierung von  $\alpha$ -ADABA durch EutE, L-2,4-Diaminobutyrat ein Induktor von EnuR sein könnte. Diese Verbindung besitzt ebenfalls primäre Aminogruppen, die durch PLP gebunden werden könnten (Abb. 3). Dennoch kommt L-2,4-Diaminobutyrat auch häufig als Intermediat im allgemeinen Aminosäurestoffwechsel von Bakterien vor (Tab. 1) und könnte so zu einer EnuR-abhängigen Induktion der Transkription von  $P_{uehA}$  führen, obwohl die Substrate Ectoin und 5-Hydroxyectoin nicht im Medium vorliegen.



**Abbildung 37: Bindung von  $\alpha$ -ADABA durch den Pyridoxal-5'-Phosphat-Cofaktor des EnuR-Transkriptionsregulator**

Dargestellt ist die Ausbildung der internen und der externen Schiff'schen Base durch die chemische Reaktion zwischen einer primären Aminogruppe und der Aldehydgruppe des PLP. Für die Formation der internen Schiff'schen Base reagiert die  $\epsilon$ -Aminogruppe (blau) des Lys-302 in der E-/O-Domäne von EnuR mit der CHO-Gruppe des PLP. Die primäre Aminogruppe (rot) des internen Induktors,  $\alpha$ -ADABA ersetzt bei Bindung in der Effektorbindedomäne die Lysin-Seitenkette, welche nun als freier Aminosäurerest in der Aminotransferasedomäne vorliegt. Der Komplex aus PLP und  $\alpha$ -ADABA verbleibt im EnuR und wird durch nicht kovalente Bindungen koordiniert.

Die Aktivierung der Transkription durch das Substrat 5-Hydroxyectoin hingegen scheint dem beschriebenen Mechanismus des *lac*-Operons ähnlich zu sein (352). Da die Derepression des Promotors eindeutig von EnuR und innerhalb dessen von dem gebundenen PLP abhängig ist (Abb. 29), muss der gebildete Induktor eine primäre Aminogruppe besitzen, die die Ausbildung eines externen Aldimins erlaubt (286,287) (Abb. 37). Die Bildung des Induktors ist von den Enzymen EutA, EutB und/oder EutC abhängig (Abb. 31). In dem postulierten Stoffwechselweg für 5-Hydroxyectoin in *R. pomeroyi* DSS-3 (15) sind jedoch ausschließlich heterocyclische 5-Hydroxyectoin-Derivate als Intermediate aufgezeigt, welche folglich auch nur sekundäre Aminogruppen enthalten (Abb. 3). Der gebildete Induktor ist daher möglicherweise ein Nebenprodukt eines der Enzymreaktionen von EutABC.



**Abbildung 38: Putative Hydrolyse von 5-Hydroxyectoin durch die Ornithin-Cyclodeaminase EutC und spontane Umlagerung**

Dargestellt ist eine mögliche enzymatische Reaktion von EutC, welches zur Hydrolyse des 5-Hydroxyectoinrings unter Anlagerung einer Aminogruppe führt. Der Ausgangsstoff und die möglichen Produkte sind namentlich bezeichnet.

EutC ist als putative Ornithin-Deaminase annotiert. Ein Enzym das klassischer Weise die Bildung von Prolin aus Ornithin unter Abspaltung eines Ammoniumions katalysiert (354). In *Corynebacterium glutamicum* konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym auch die entsprechende Rückreaktion katalysieren und so aus Prolin Ornithin gebildet werden kann (355). Wird das gleiche Reaktionsprinzip hypothetisch auf 5-Hydroxyectoin angewandt, könnten, je nach Angriff der Ammoniumionen, zwei verschiedene heteroaliphatische

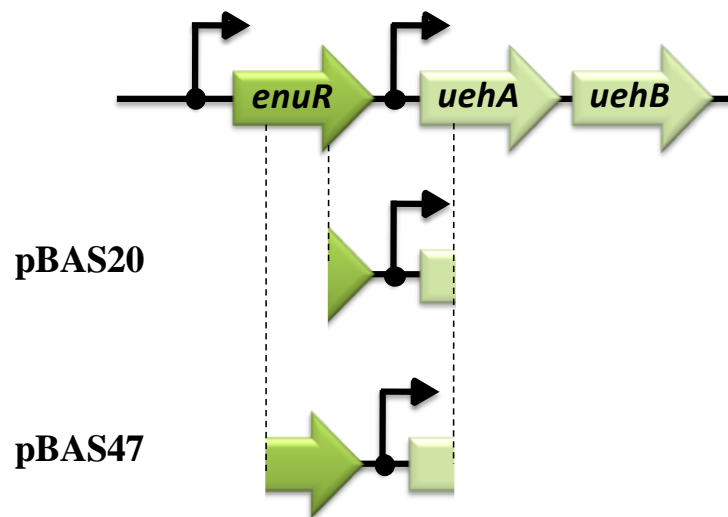
Verbindungen (N $\alpha$ -Acetimid-2,4-Diamino-3-Hydroxybutyrat und N $\gamma$ -Acetimid-2,4-Diamino-3-Hydroxybutyrat) entstehen (Abb. 38), welche mittels der primären Aminogruppen durch PLP gebunden werden könnte und so die Transkription des Promotors vor *uehA* beeinflussen könnten (Abb. 31). Aus thermodynamischen Gründen wäre es außerdem möglich, dass sich die gebildeten Intermediate spontan zu N $\alpha$ -Acetyl-2,4-Diamino-3-Hydroxybutyrat und N $\gamma$ -Acetyl-2,4-Diamino-3-Hydroxybutyrat umlagert (Abb. 38). In einem Thermophoreseexperiment konnte keine Bindeaffinität zwischen EnuR und N $\gamma$ -Acetyl-2,4-Diamino-3-Hydroxybutyrat nachgewiesen werden (Abb. A4 D). Dies schließt jedoch keines der anderen drei Moleküle als potentielle interne Induktoren für EnuR aus. Auch ist es nicht auszuschließen, dass das EutA- oder EutB-Enzym heteroaliphatische Verbindungen als Nebenprodukt bilden können. Ob und welches dieser Enzyme für die Bildung des internen Induktors verantwortlich ist, könnte durch chromosomale Deletionen der einzelnen Gene des EutABC-Genclusters nachgewiesen werden.

Die enzymatischen Aminotransferasen der Klasse I sind im Allgemeinen als Dimere aktiv, in denen jede Untereinheit ein Molekül PLP bindet (220). Mit Hilfe dieser prosthetischen Gruppe transferieren sie die primäre Aminogruppe einer Aminosäure auf die Ketogruppe einer Ketosäure (221). Die E-O-Domäne von GabR besitzt alle konservierten Aminosäuren, die für die Koordination eines PLP-Cofaktors notwendig sind. GabR ist in der Lage eine Halbreaktion des Transaminierungszyklus zwischen PLP und GABA auszuführen. Um eine vollständige Transaminierungsreaktion, wie bei Aminotransferasen bekannt, durchzuführen, müsste GabR in der Lage sein, eine entsprechende Ketosäure zu binden. Die Substratspezifität von Aminotransferasen der Klasse I wird durch zwei, im aktiven Zentrum lokalisierte, Argininreste determiniert (232–234). GabR besitzt einen dieser konservierten Argininreste, welcher die Bindung von GABA ermöglicht, nicht jedoch das zweite, welches  $\alpha$ -Ketoglutarat oder ein anderes Substrat der Transaminierung stabilisieren könnte und kann daher keine vollständige Aminotransferasereaktion ausführen (229–231). Ein Aminosäuresequenzvergleich von EnuR aus *R. pomeroyi* DSS-3 und der Aspartataminotransferase (AspC) aus *E. coli* zeigt die Konservierung eines Argininrestes (Arg386 des *E. coli*-Enzyms) aber nicht des zweiten Arginins (Arg292) (233,356) (Daten nicht gezeigt). Daher ist auch für EnuR die Ausführung eines vollständigen Reaktionszyklus, ähnlich dem der enzymatischen Aminotransferasen, nicht wahrscheinlich.

### 5.3.5 Der Transkriptionsfaktor AsnC

Die Lrp/AsnC-Familie von transkriptionellen Regulatoren ist im Reich der Bakterien und dem der Archaeen weit verbreitet und meist in den Metabolismus von Aminosäuren und deren Derivaten involviert (131). So ist es nicht verwunderlich, dass der AsnC-Typ Regulator, welcher in dem *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon von *R. pomeroyi* DSS-3 kodiert wird, ebenfalls in den Katabolismus der Aminosäurederivate Ectoin und 5-Hydroxyectoin integriert ist. Der beschriebene Typ Transkriptionsregulator kann sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen ausführen. In *Pyrococcus furiosus* verhindert LrpA die Transkription durch das Blockieren des Transkriptionsstarts (357). In *Methanocaldococcus jannaschii* dagegen bindet Ptr2 stromaufwärts der TATA-Box und aktiviert die Transkription der entsprechenden Gene durch die Rekrutierung weiterer Transkriptionsaktivatoren (358). In *R. pomeroyi* DSS-3 wirkt AsnC ebenfalls als Transkriptionsaktivator auf den Promotor vor *uehA* (Abb. 32). Die funktionelle Einheit dieser Regulatoren entsteht erst durch Oligomerisierung zu Dimeren, Tetrameren, Octameren oder auch Hexadecameren (238–243), welche dann an ihren Zielpromotor binden. Die bisher beschriebenen Promotoren weisen meist mehrere DNA-Bindestellen auf, die aber selten über offensichtliche Symmetrien verfügen. Jedes Homodimer innerhalb des gesamten Oligomers bindet dabei kooperativ eine Erkennungssequenz von etwa 13 - 25 bp Länge (132,359). Je mehr Dimere in einem vollständig assemblierten AsnC-Regulator vorhanden sind, desto mehr Erkennungssequenzen sind notwendig. Die tatsächlichen Binderegionen sind durch Linker getrennt, die in ihrer Länge zwischen 7 und 18 bp variieren (359). Die globuläre Struktur dieser Regulatorklasse verlangt, dass die Promotor-DNA in einer Histon-ähnlichen Art und Weise um das Lrp/AsnC-Protein gewickelt wird (241). Die Länge der involvierten DNA-Sequenz variiert folglich stark, abhängig von der Anzahl der Dimere im Protein, der Länge der DNA-Erkennungssequenz und dem Linker zwischen diesen. Welchen oligomeren Zustand das AsnC-Protein aus *R. pomeroyi* DSS-3 einnimmt ist nicht vorhersagbar. Es lässt sich aber vermuten, dass die unvollständige Aktivierung des Promotors in jener *lacZ*-Fusion, die nur 433 bp stromaufwärts von *uehA* umfasste (auf pBAS21) im Gegensatz zu jener die 980 bp umspannte (auf pBAS47) (Abb. 39), durch einen Verlust eines Teil der AsnC-bindenden DNA-Sequenz hervorgerufen wird (Abb. 15). Es wäre daher zu erwarten, dass der oligomere Zustand des Proteins aus mehreren Dimeren gebildet wird. Vertreter dieser Regulatorfamilie binden eine Reihe von Aminosäure-Effektoren, wie L-Leucine, L-Glutamine, L-Alanine, L-Tyrosine, L- Tryptophane, oder L-Aspartate, die die entsprechende regulatorische Funktion beeinflussen (241,246,247). Auch über die Art des Effektors von dem hier beschriebenen AsnC lässt sich nur spekulieren. Eine chromosomale Deletion von *ssd* und *atf*, führte zu keinem signifikanten Verlust der Induktion der Transkription von  $P_{uehA}$  (Abb. A5). Daher können die

Reaktionsprodukte beider Enzyme, Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd und L-Aspartat, mit hoher Wahrscheinlichkeit als Co-Aktivatoren ausgeschlossen werden. Nicht zu letzt auch, weil diese in hoher Abundanz im bakteriellen Stoffwechsel vorkommen (Tab. 1) und so zu keiner spezifischen Aktivierung der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  durch AsnC führen würden. Weitere Möglichkeiten für Co-Aktivatoren stellen die Induktoren, die auch von EnuR gebunden werden, oder L-2,4-Diaminobutyrat, das Produkt der EutE-Reaktion, dar (Abb. 3).



**Abbildung 39: Genetische Organisation der 5'-Region des katabolen Ectoin-Operons und die Ableitung der *lacZ*-Fusionen für die Reportergeranalysen**

Dargestellt ist die schematische Organisation der 5'-Region des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operons. Die zwei putativen Promotoren sind als gebogene Pfeile dargestellt. Die Abgrenzungen für die Reportgenfusionen sind mit gestrichelten Linien markiert. Die Bezeichnung des aus der Fusion resultierenden Plasmids ist angegeben.

### 5.3.6 Das NtrXY-Zweikomponentensystem

Die Rolle des NtrXY-Zweikomponentensystems in der Stickstoffkontrolle bakterieller Zellen scheint vielfältig. So konnte für *A. caulinodans*, *A. brasilense*, *S. meliloti* und *Brucella*-Spezies gezeigt werden, dass dieses in die Verwendung alternativer Stickstoffquellen, symbiotische Knöllchenbildung, die Antwort auf Sauerstoffmangel und das Überleben im Wirtsorganismus involviert ist (18,266,267). In vielen bakteriellen Spezies befindet sich stromaufwärts des *ntrXY*-Operons ein weiteres Operon der generellen Stickstoffkontrolle. Dieses *nifR3-ntrBC*-Operon ist eines der Hauptkomponenten der allgemeinen Stickstoffkontrolle und sichert das Überleben unter Stickstoffmangel (253,264,360). Auch in dem marinen Bakterium *R. pomeroyi* DSS-3 befindet sich stromaufwärts des *ntrXY*-Operons das homologe *nifR3ntrBC*-Operon. Im Gegensatz zu anderen Organismen (19), überlappen die kodierenden Bereiche von *ntrC* und *ntrY* jedoch nicht. Die Sensorkinase NtrY besitzt den

Berechnungen des TOPCONS-Servers (291) zu Folge vier membranspannende Domänen. Dies resultiert in zwei extrazellulären Proteinabschnitten (Abb. A12). Besonders auffällig ist dabei, dass die zweite dieser extrazellulären Schleifen, etwa 200 bp umfasst. Somit liegt die Vermutung nahe, dass NtrY extrazelluläre Signale misst, während sein Homolog NtrB ein ausschließlich cytoplasmatisches Protein ist (361) und daher nur Signale aus dem Zellinneren verarbeiten kann. Eine chromosomale Deletion des *ntrXY*-Zweikomponentensystems führte in *R. pomeroyi* DSS-3 zu einem vollständigen Verlust des Wachstums auf beiden Ectoinen als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Die Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle und der Zusatz diverser alternativer Stickstoffquellen, wie Cholin und  $\gamma$ -Crotonobetain, führte in jedem Fall zu einem zeitlich stark verzögerten Wachstum (Abb. 13). Der letztendliche Wachstumsertrag wurde jedoch nicht beeinflusst. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass sowohl eine Mutation im *ntrX*-Gen als auch eine Mutation des homologen *ntrC*-Gens zu einem verzögerten Wachstum auf alternativen Stickstoffquellen führt (18). Dass es zu keinem vollständigen Verlust des Wachstums kommt, liegt an der gegenseitigen Beeinflussung der *ntrBC*- und des *ntrXY*-Systeme (360). Eine Ausnahme bildete interessanterweise die Verwendung von Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Stickstoffquelle. Das Wachstum war nicht nur stark verzögert, sondern erreichte auch nach 69 Stunden nur etwa 1/4 bis 1/5 des Wachstumsertrages des Wildtyps. Dies deutet auf eine essentielle Rolle des NtrXY-Zweikomponentensystems für die Transkriptionskontrolle des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Operons hin. Tatsächlich zeigte sich die Aktivierung der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  als im gleichen Maß stark eingeschränkt, wie auch nach dem Verlust des AsnC-Regulators (Abb. 32 und 33, Tab. A1). Der Verlust der Aktivierung kann auf zwei Wegen erklärt werden: a) Der Antwortregulator NtrX interagiert direkt mit dem  $P_{uehA}$  und bewirkt als dritter Regulator die Aktivierung der Transkription der katabolen Gene oder b) Das NtrXY-Zweikomponentensystem übt eine transkriptionelle Kontrolle auf das *asnC*-Gen des *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-attf*-Operon von *R. pomeroyi* DSS-3 aus. Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass das Ntr-System der generellen Stickstoffkontrolle die Expression von Lrp/AsnC-abhängigen Genen beeinflusst (264). Das NtrXY-System kann die Transkription einer Vielzahl von Genen und Operons direkt positiv oder negativ regulieren (252), dennoch übt es seinen Einfluss in vielen Fällen aber indirekt über das Adapterprotein Nac (Nitrogen assimilation control) aus. Nac gehört zu der LysR-Familie von Transkriptionsfaktoren (362) und reguliert die Expression von Genen, die in den Stickstoffmetabolismus involviert sind (252,363,364). Dabei ist besonders auffällig, dass es sich in *E. coli* bei etwa 2/3 der beeinflussten Gene oder Operons um solche handelt, die für den Transport von alternativen Stickstoffquellen aus dem Medium verantwortlich sind (252). Eine Nac-Nulldeletion führt in *E. coli* zu einer Reihe von Phänotypen. Dazu gehört unter anderem das verlangsamte

Wachstum auf Cytosin, schnelleres Wachstum auf Arginin oder die Suppression der konstitutiven Ntr-Mutante, die das Wachstum auf Serin als alleinige Stickstoffquelle verhindert (364). Dies und die Beobachtung, dass das Nac-Protein das *gabDTPC*-Operon von *E. coli* (welches, wie in *B. subtilis* auch, für den Transport und Katabolismus von  $\gamma$ -Aminobutyrat verantwortlich ist) unter limitierten Stickstoffbedingungen aktiviert (252), spricht für eine Beteiligung des Nac-Proteins in den Katabolismus von Ectoin/ 5-Hydroxyectoin in *R. pomeroyi* DSS-3 (Abb. 40).

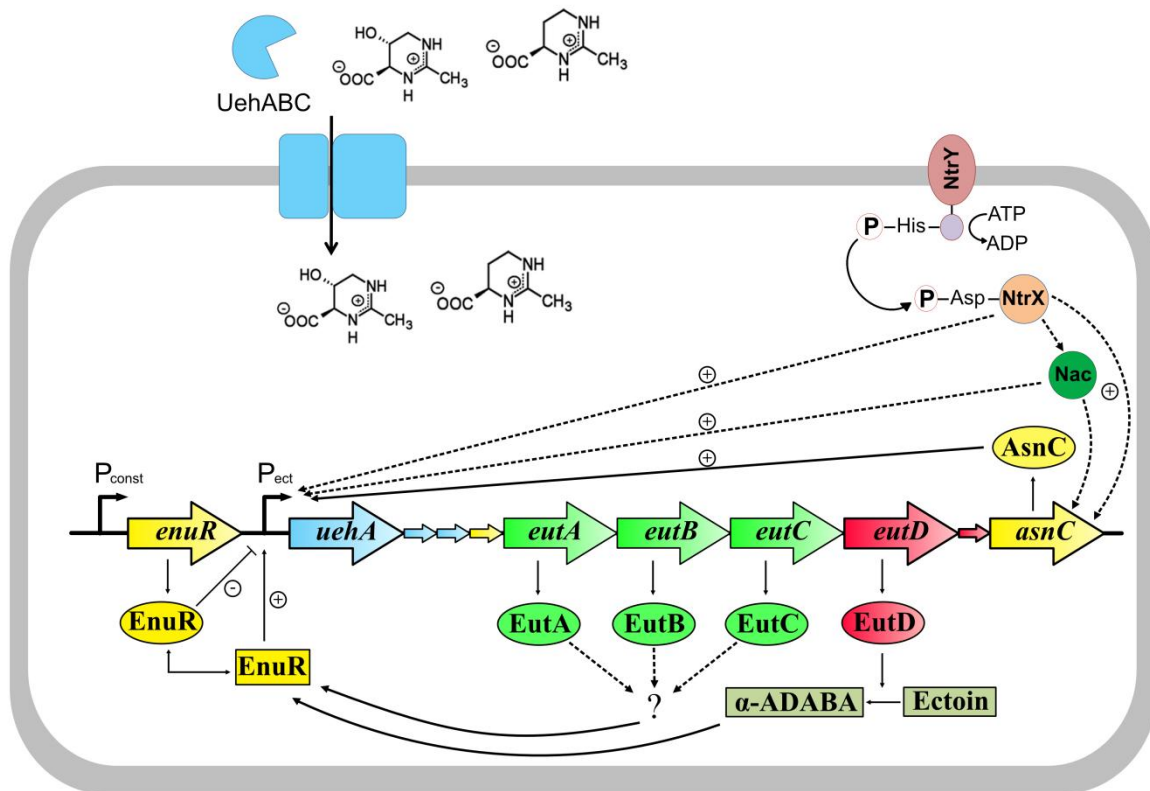
#### 5.4 Modell der transkriptionellen Kontrolle des Ectoin/5-Hydroxyectoin-Katabolismus in *R. pomeroyi* DSS-3

Die vorliegenden Studien zeigen, dass die Expression des katabolen *enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*-Operon aus *R. pomeroyi* DSS-3 von zwei Promotoren aus angetrieben wird. Die Transkription des gesamten Operons erfolgt von einem konstitutiven Promotor vor *enuR* und sichert ein basales Level aller beteiligten Proteine auch in Abwesenheit von Ectoin und 5-Hydroxyectoin (Abb. 15). Ein weiterer, substratinduzierbarer Promotor befindet sich stromaufwärts des *uehA*-Gens und wird in Abwesenheit der Substrate im Medium durch den PLP-abhängigen Transkriptionsregulator EnuR reprimiert (Abb. 15). Befindet sich Ectoin und/oder 5-Hydroxyectoin im Medium werden diese, über die in der Zellmembran vorhandenen spezifischen UehA-Typ TRAP-Transporter (127), in das Cytoplasma aufgenommen. Der basale Level an vorhandenen katabolen Enzyme ist ausreichend, um die Substrate abzubauen, wodurch die internen Induktoren des EnuR-Transkriptionsregulators gebildet werden (Abb. 30 und 31). Die Ausbildung einer externen Schiff'schen Base zwischen den primären Aminogruppen der Induktoren und dem PLP des EnuR, führt zu einer Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors und damit verbunden zu einer Derepression und Aktivierung des Promotors vor *uehA* (Abb. 15). Die vollständige Aktivierung der Transkription von diesem Promotor ist außer von EnuR auch von AsnC abhängig. Das *asnC*-Gen wird wie *enuR* ebenfalls in dem katabolen Operon kodiert (Abb. 2). Die Funktion dieses AsnC-Regulators als Aktivator von  $P_{uehA}$  ist essentiell für das Wachstum von *R. pomeroyi* DSS-3 auf Ectoin und 5-Hydroxyectoin (Abb. 12). Eine dritte wichtige regulatorische Komponente bildet das Zweikomponentensystem NtrXY (18,266,267). Die Funktionsfähigkeit des Zweikomponentensystems ist entscheidend für die effektive Verstoffwechselung der hier untersuchten Aminosäurederivate als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und hat direkt oder indirekt einen positiven Effekt auf die Aktivierung der Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  (Abb. 33). Für diesen Einfluss gibt es mehrere Möglichkeiten: a) NtrX~P bindet direkt an eine Operatorsequenz im *uehA*-Promotor und aktiviert so die Transkription; b) NtrX~P aktiviert die Transkription von *asnC*; c) NtrX~P



aktiviert die Transkription der Gene, die für das Adapterproteins Nac kodieren, welches dann entweder die Transkription ausgehend von  $P_{uehA}$  oder einem Promotor vor *asnC* positiv regulieren kann (Abb. 40).

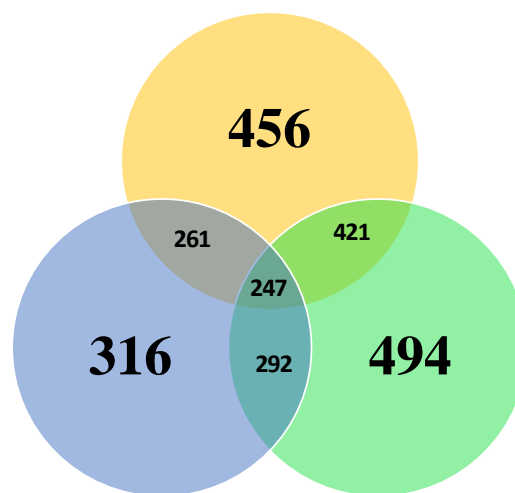
Im Umkehrschluss führt eine eventuelle Abnahme der Substratkonzentration im Medium zu einer verminderten Aufnahme und Umsetzung von Ectoin und 5-Hydroxyectoin in der bakteriellen Zelle. Folglich sinken die interne Konzentrationen der internen Induktoren des EnuR-Transkriptionsfaktors. Unterhalb eines bestimmten Schwellenwerts wird die externe Aldiminbindung in der Effektorbindedomäne von EnuR aufgelöst und wieder durch das interne Aldimin mit Lysin-302 ersetzt (Abb. 37). EnuR nimmt daraufhin seine ursprüngliche Repressorkonformation ein und verhindert die Expression der in *cis*-liegenden Gene des Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Transports und -Katabolismus (Abb. 40).



**Abbildung 40: Modell der Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-abhängigen Transkriptionsregulation des  $P_{uehA}$  in *R. pomeroyi* DSS-3**

Dargestellt ist das katabole Ectoin/5-Hydroxyectoin-Operon aus *R. pomeroyi* DSS-3. Gene sind als Pfeile dargestellt und für den Regulationsprozess relevante Gene sind hervorgehoben und beschriftet. Proteine sind als Ovale, Kreise oder Rechtecke dargestellt. Die entsprechenden regulatorischen Einflüsse sind durch Pfeile markiert und je nach Art der Regulation mit einem + oder - versehen. Hypothetische Reaktionen oder Aktivierungsmechanismen sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt.

In der substratinduzierten Transkriptionskontrolle des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Genclusters aus *R. pomeroyi* DSS-3 spielen daher drei Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle: EnuR, AsnC und der Antwortregulator NtrX (Abb. 40). Die phylogenetischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, verdeutlichen, dass jede der gefundenen 539 putativen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-katabolisierenden bakteriellen Spezies mindestens eines dieser Regulatorgene besitzt (Abb. 35). Insbesondere das *asnC*-Gen scheint in der Evolution konserviert, da es bereits in den bakteriellen Spezies, welche sich an der Wurzel des Baumes befinden, vorhanden ist. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass von 539 der untersuchten Stämme nur 45 kein *asnC*-Gen besitzen. Wie aus Abbildung 42 zu entnehmen ist, besitzen etwa die Hälfte (247 bakterielle Spezies) der untersuchten Bakteriengenome sogar alle drei Regulatoren. Dies ist in den meisten *Alphaproteobacteria* der Fall, konnte aber auch in *Gammaproteobacteria* und dem einzelnen Deltaproteobakterium gefunden werden. Die Konservierung von sowohl *enuR* als auch *asnC* in einem Operon und das Vorhandensein eines zusätzlichen konservierten Systems der Stickstoffkontrolle in diesen Bakterien, lässt den Schluss zu, dass die Regulation der Transkription des katabolen Ectoin/5-Hydroxyectoin-Operons nach dem beschriebenen Schema (Abb. 40) nicht nur in *R. pomeroyi* DSS-3 auftritt, sondern vor allem in der Klasse der *Alphaproteobacteria* konserviert ist.



**Abbildung 41: Quantitative Verteilung der Transkriptionsfaktoren**

Dargestellt ist die Verbreitung der untersuchten Transkriptionsfaktoren aus *R. pomeroyi* DSS-3 in den 539 putativ 5-Hydroxyectoin/Ectoin-katabolisierenden Organismen. Die Kreise stehen für die einzelnen Regulatorgene: gelb für *enuR*, grün für *asnC* und blau für das *ntrXY*-Zweikomponentensystem. Die große Zahl in jedem Kreis entspricht der Anzahl Organismen, die diesen Regulator entweder im *eutD*-Gencluste (*enuR* oder *asnC*) oder in ihrem Genom (*ntrXY*) aufwiesen. Die bezifferten Überlappungen zwischen den Kreisen zeigen auf, wie viele Organismen zwei oder sogar alle drei der untersuchten Regulatoren besitzen.

## 5.5 Ausblick

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin durch das marine Bakterium *R. pomeroyi* DSS-3. Es konnten nicht nur Einblicke in die Physiologie des Alphaproteobakteriums gewonnen werden, sondern es wurden auch ausführliche Untersuchungen zu der genetischen Kontrolle der Expression der katabolen Gene und des TRAP-Transportersystems durchgeführt. Diese komplexe Transkriptionskontrolle ist neben dem Hauptregulator EnuR, welcher als Repressor und Aktivator wirkt, außerdem von einem Protein der 'feast and famine'-Familie von Transkriptionsregulatoren, AsnC, und dem Zweikomponentensystem der generellen Stickstoffkontrolle, NtrXY, abhängig (Abb. 40). Dennoch bleiben viele offene Fragen, die in zukünftiger Arbeit adressiert werden müssen.

### 1. Wo binden EnuR und die anderen Transkriptionsfaktoren im $P_{uehA}$ ? Überlappen die DNA-Bindemotive dieser Proteine oder erfolgt die Promotorerkennung separat voneinander?

Diese Fragen können mit Hilfe von DNase I-Footprinting-Analysen geklärt werden. Voraussetzung ist dabei, dass nicht nur EnuR stabil überproduziert werden kann, sondern auch AsnC und NtrX.

### 2. Die Interaktionen zwischen den Transkriptionsregulatoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Regulationsmodelle vorgestellt, in der vor allem AsnC und das Zweikomponentensystem NtrXY in unterschiedlichen Abhängigkeiten zueinander stehen und sich damit verschiedene Möglichkeiten für deren Einfluss auf  $P_{uehA}$  erschließen. Wie genau das regulatorische Netzwerk funktioniert, lässt sich zunächst durch Deletionen von zwei oder mehreren dieser Regulatorgene im Chromosom von *R. pomeroyi* DSS-3 bestimmen. Da bisher nur ein effektiver Selektionsmarker für *R. pomeroyi* DSS-3 bekannt ist, müssen markerfreie Deletionen erstellt werden.

### 3. Was ist der Induktor von EnuR, wenn *R. pomeroyi* DSS-3 auf 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle wächst?

Der interne Induktor von EnuR, wenn *R. pomeroyi* DSS-3 auf 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle wächst, wird durch die Enzyme EutA, EutB und/oder EutC gebildet. Um eine genaue Aussage über die Art der chemischen Verbindung und deren Ursprung treffen zu können, müssen die benannten Gene zunächst im einzelnen deletiert und der Einfluss der Deletionen auf die Genexpression ausgehend von  $P_{uehA}$  ermittelt werden. Putative Induktoren müssen dann möglicherweise über chemische Synthesen gewonnen werden, da sie, wie  $\alpha$ -ADABA auch, nicht kommerziell erwerblich sind.

#### 4. Was ist der Ligand von AsnC?

Diese Frage, lässt sich wie für EnuR auch, mittels Thermophorese bestimmen. Wie bereits erwähnt, setzt dies die stabile und quantitative Überproduktion des AsnC-Proteins voraus; dies ist in bisherigen Versuchen nicht gelungen.

#### 5. Wie erfolgt die Reizerkennung durch die Sensorkinase NtrY?

Interessanter Weise besitzt die Sensorkinase NtrY einen langen extrazellulären Bereich (~ 200 bp) der möglicherweise der Bindung von Ectoin und 5-Hydroxyectoin dienen könnte. Ob dieser externe Bereich für die Erkennung von Ectoinen außerhalb der Zelle erforderlich ist, oder ob die Aminosäurederivate zunächst über den TRAP-Transporter aufgenommen werden müssen um erkannt zu werden, lässt sich bestimmen indem dieser extrazelluläre Bereich der Sensorkinase überproduziert und in Interaktionsstudien mit Ectoin und 5-Hydroxyectoin eingesetzt wird. Eine Thermophorese-Experiment, wie zuvor beschrieben, wären eine geeignete Untersuchungsmethode.

#### 6. Die biochemische Charakterisierung von EutD aus *R. pomeroyi* DSS-3.

EutD ist das Schlüsselenzym des Katabolismus von Ectoin und 5-Hydroxyectoin. Für EutD/DoeA aus *H. elongata* konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Ectoin sowohl zu  $\alpha$ -ADABA, als auch  $\gamma$ -ADABA hydrolysiert (128). Da *R. pomeroyi* DSS-3 aber im Gegensatz zu *H. elongata* keine Ectoin-Synthesegene besitzt, stellt sich die Frage, ob die enzymatische Reaktion von EutD ebenfalls zu beiden Reaktionsprodukten führt, oder ob dieses ausschließlich spezifisch  $\alpha$ -ADABA bildet. Dies lässt sich in einem Enzym-Assay bestimmen, da beide Reaktionsprodukte in einer HPLC-Analysen identifiziert werden können. Dies setzt ebenfalls voraus, dass die Ectoin-Hydrolase erfolgreich überproduziert werden kann. Die codonoptimierte heterologe Überproduktion von EutD in *E. coli* war bisher nicht erfolgreich und resultierte in sehr geringen Konzentrationen von gelöstem Protein. Möglicherweise würde die Nutzung alternativer Expressionssysteme, wie *lac* oder *tet*-Promotoren, oder die homologe Expression der entsprechenden Gene in *R. pomeroyi* DSS-3 unter Kontrolle des  $P_{uehA}$ .

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Material

#### 6.1.1 Geräte

**Tabelle 2: Laborgeräte und Hilfsmittel**

Bezeichnung	Quelle
4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer	Applied Biosystems
Bottletopfilter BT50 0.2	Sarstedt
Gelfiltrationssäulen	IBA
Electrophoresis Power Supply E455	Consort
Elektrophorese-Apparaturen für Mini-Gele	BioRad
Gene Pulser X cell Elektroporations System	BioRad
Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific
Feinwaage Precusion plus	OHAUS®
FPLC ‚Äktapurifier‘ UPC-900	AmershamPharmaciaBiotech
French Press	Aminco
Gelfiltrationssäulen	IBA
Gel Jet Imager	INTAS GmbH
Glaskolben	VWR
Halbmikro-Küvetten	Sarstedt
HPLC 1260 Infinity	Agilent Technologies
HPLC Säule Gram.Sil 100 Amino-1 PR, 3 µm	Grace
HPLC Säule Gemini, 5U C18 110A (150x4.6 5 micron)	Phenomenex
Hubpipetten	GILSON
Hubpipettenspitzen	Sarstedt
Laborzentrifugen Mikro20	Hettich
Massenspektrometer	Synapt G2Si
Mikroskop Nikon SMZ800	Nikon
MiniProtean® II Apparatur	Bio-Rad
NanoDrop ND-1000	NanoDrop
Nylon Membran (NytranN)	Schleicher&Schuell
Parafilm	American National Can
Perfusor	B. Braun Biotech International
Perfusor-Spritze	B. Braun Biotech International
PeqStar® PCR System	Peqlab
pH-Messgeräte WTW	Inolab
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präzessionswaage CPI24S	Sartorius
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 2 ml	Sarstedt
Schüttelinkubator INNOVA 44	New Brunswick Scientific
Sorval RC-5B	DuPont Instruments

Bezeichnung	Quelle
Spektralphotometer Ultrospec2100 pro	Amersham/Bioscience
Spritzen	B. Braun Biotech International
Stammhaltungsröhrchen	Sarstedt
STREP-Tactin®-Superflow® Säulen	IBA GmbH Bio TAGnology
Ultraschallsonde LABSONIC U	B. Braun Biotech International
UV-Transilluminator Bio Imaging System	Syngene

### 6.1.2 Chemikalien

**Tabelle 3: Chemikalien**

Bezeichnung	Quelle
Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 37,5:1	AppliChem GmbH
Acrylamid 4K-Lösung (40 %)	AppliChem GmbH
Agarose	PeqLab Biotechnologie GmbH
4-Aminobenzoessäure	Fluka
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH
Ammoniumcholrid	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma®
Anhydrotetracyclin (AHT)	IBA GmbH
Bisacrylamid 4K-Lösung (2 %)	AppliChem GmbH
Borsäure	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Sigma Aldrich®
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH
Casein-Hydrosylat	Carl Roth GmbH
Chloroform	Carl Roth GmbH
Chlorwasserstoffsäure	Carl Roth GmbH
Citronensäure	Carl Roth GmbH
Cobalamin (Vitamin B12)	Fluka
Coomassie-Silver Blue G250	Carl Roth GmbH
d-Biotin (Vitamin B7)	Biomol
Desthiobiotin	IBA GmbH
D-Glucose	Sigma®
Diammoniumsulfat	Carl Roth GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare
Deoxynukleosidtriphosphat-Mix(dNTP)	Thermo Fisher Scientific
Deoxyadenosintriphosphat (dATP)	Thermo Fisher Scientific
Deoxycytosintriphosphat (dCTP)	Thermo Fisher Scientific
Deoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Thermo Fisher Scientific
Deoxythymidintriphosphat (dTTP)	Thermo Fisher Scientific
Ectoin	Bitop
Eisensulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH

Bezeichnung	Quelle
Ethanol (vergällt, unvergällt)	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Fluka®
Ethylendiamintetra-Essigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ficoll	Serva
Folsäure	Fluka
Glucose	Carl Roth GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Glycinbetain	Sigma
Harnstoff	MERCK
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
4'-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure (HABA)	Carl Roth GmbH
5-Hydroxyectoin	Bitop
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Lennox LB Agar	INVITROGEN™
Liponsäure	Fluka
Luria-Bertani-Medium	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH
Methanol	MERCK
Monomethylamin	Sigma Aldrich
3-Morpholinopropansulfonat(MOPS)	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	Gerbu
Nicotinsäure (Vitamin B3)	Fluka
o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (ONPG)	Serve
Pantothenat (Vitamin B5)	Fluka
Polyethylenglycol 8000	Carl Roth GmbH
Pyridoxin (Vitamin B6)	Fluka
Sea Salt	Sigma Aldrich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	AppliChem
Thiamin (Vitamin B1)	Fluka
Trishydroxymethylaminomethan(Tris)	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Appllichem
Tween	Serva
Xylencyanol	Carl Roth GmbH

### 6.1.3 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
High Pure Plasmid Isolation Kits	Roche
High Pure PCR product Purification Kit	Roche
DIG-RNA labeling Mix	Roche
Dig Northern Starter Kit	Roche
Quick Change Lightning Site-directed mutagenesis	Agilent

### 6.1.4 Antibiotika

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration <i>E. coli</i>	Endkonzentration <i>R. pomeroiy</i> DSS-3	Hersteller
Rifampicin		20 µg/ml	SERVA
Ampicillin	100 µg/ml		Carl Roth GmbH
Spectinomycin	50 µg/ml	150 µg/ml	Sigma
Gentamycin	5 µg/ml	20 µg/ml	Carl Roth GmbH
Kanamycin	50 µg/ml	80 µg/ml	SERVA

### 6.1.5 Enzyme und Standards

Tabelle 6: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Carl Roth GmbH
Phusion Polymerase	Im Labor überexprimiert und aufgereinigt
<i>PstI</i>	Thermo Fisher Scientific
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche
T4-Ligase	Thermo Fisher Scientific
T7-RNA Polymerase	Roche
<i>XbaI</i>	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 7: Verwendete Standards

Bezeichnung	Hersteller
MassRuler™ DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

### 6.1.6 Datenbanken und Tools

Tabelle 8: verwendete Datenbanken und Tools

Bezeichnung	Quelle
BioEdit	IBIS Biosciences
ImageJ	Java
Interactive Tree of Life (iTOL)	Letunic and Bork, 2011
ClustalΩ	Larkin et al., 2007
Department of Energy Joint Genome Institute	(293,365)
NCBI-pubmed	National Center for Biotechnology Information
ProtParam (ExPASy Server)	(284)
Tm-Calculator	<a href="https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html">https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html</a>



## 6.1.7 Allgemeine Puffer

**Tabelle 9: 5-fach AP-Puffer**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl <sub>2</sub>	5	mM
→ A. bidest ad 1l, pH 9,5		

**Tabelle 10: TE-Puffer**

Chemikalien	Menge	
Tris	1,21	g
EDTA	0,292	g
→ A. bidest ad 1l, pH 8,0		

**Tabelle 11: 10-fach TBE-Puffer**

Chemikalien	Menge	
Tris	108	g
Borsäure	55	g
EDTA	5,85	g
→ A. bidest ad 1l, pH 8,3		

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Stammhaltung

Die Langzeitlagerung von Bakterienstämmen wurde durch die Anlegung von Glycerin-kulturen ermöglicht. Dazu wurde eine einzelne, auf LB-Agar wachsende Kolonie, in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker aerob über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit sterilem 86 % (v/v) Glycerin im Verhältnis 1:4 versetzt und jeweils 2 ml in Stammhaltungsröhrchen überführt. Die so gewonnenen Glycerinkulturen wurden bei – 80°C gelagert.

### 6.2.2 Medien und Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte aerob auf Luria Bertani (LB) Agarplatten (366) oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C. Um auf rekombinante Plasmide selektieren zu können, wurden die entsprechenden Selektionsmarker, den Angaben in Tabelle 5 entsprechend, hinzugegeben. Für die Überproduktion der EnuR-Proteine, wurden Zellen des *E. coli* B Stamms BL21 (DE3)(367) in 1 x Minimal Medium A (MMA) (273) kultiviert. *R. pomeroyi* DSS-3 (14) und seine Rif<sup>R</sup> Derivate wurden routinemäßig auf ½ YTSS Agarplatten (368) vermehrt. Für Wachstumsversuche im Flüssigmedium wurde *R. pomeroyi* DSS-3 in einem definierten Basalmedium kultiviert (369), welches mit einigen Modifikationen übernommen wurde. Die zugesetzten Komponenten sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Dem Medium wurden 0,1 mM Methionin, 0,1 mM Serin und 0,1 mM Glutamat

zugesetzt, da diese eine deutliche Verbesserung des Wachstums von *R. pomeroyi* DSS-3 und seinen Derivaten zu Folge hat (Daten nicht gezeigt). Standardmäßig wurde Glucose (28 mM) als Kohlenstoffquelle und Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) (0,2 mM) als Stickstoffquelle für *R. pomeroyi* DSS-3 verwendet. Die entsprechenden Selektionsmarker wurden, wie in Tabelle 4.1.4 aufgeführt, hinzugegeben.

**Tabelle 12: Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), flüssig**

Chemikalien	Menge	
LB Base	20	g
→ A. bidest ad 1 l, pH 7		

**Tabelle 13: Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), fest**

Chemikalien	Menge	
LB-Medium flüssig	1	l
Agar	15	g

**Tabelle 14: ½ YTSS**

Chemikalien	Menge	
Trypton	1,25	g
Yeast extract	2	g
Seesalz	20	g
→ A. bidest ad 1 l		

**Tabelle 15: ½ YTSS, fest**

Chemikalien	Menge	
½ YTSSflüssig	1	l
Agar	15	g

**Tabelle 16: 10 x Minimal Medium A (MMA) (273)**

Chemikalien	Menge	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	105	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	45	g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	10	g
Natriumcitrat	5	g
→ A. bidest ad 1 l, pH 7		

**Tabelle 17: 1 x MMA (273)**

Chemikalien	Menge	
10 x MMA	100	ml
Glucose	0,5	%
Caseinhydrolysat	0,5	%
Thiamin	1	mg
MgSO <sub>4</sub>	1	mM
→ A. bidest ad 1 l		

**Tabelle 18: 5 x Minimal Medium 63 (M63) (370)**

Chemikalien	Menge	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	10	g
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2,5	g
→ A. bidest ad 1 l, pH 7 mit KOH		

**Tabelle 19: 5 x M63 mit 0,4 M NaCl (370)**

Chemikalien	Menge	
M63	1	x
NaCl	400	mM
Glucose	1	%
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1	mM
Ectoin oder 5-Hydroxyectoin	20	mM

**Tabelle 20: Basalmedium für *R. pomeroyi* nach Baumann et al.(369)**

Chemikalien	Menge	
MOPS (ph 7,5)	50	mM
NaCl	200	mM
KCl	10	mM
NH <sub>4</sub> Cl	200	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33	mM
CaCl <sub>2</sub>	10	mM
MgSO <sub>4</sub>	50	mM
FeSO <sub>4</sub>	100	mM
Vitamin Mix A	1 x	
Vitamin Mix B	1 x	
Methionin	0,1	mM
Serin	0,1	mM
Glutamat	0,1	mM

Als Kohlenstoffquellen wurden Glucose, Ectoin oder 5-Hydroxyectoin jeweils in einer Konzentration von 28 mM verwendet. Wenn Ectoin und 5-Hydroxyectoin alleinige Kohlen- und Stickstoffquelle sein sollten, wurde das NH<sub>4</sub>Cl durch H<sub>2</sub>O ersetzt.

**Tabelle 21: Basalmedium für *R. pomeroyi* , fest (369)**

Chemikalien	Menge	
Basalmedium, flüssig	1	l
Agar	15	g

**Tabelle 22: 200 x Vitamin Mix A**

Chemikalien	Menge	
d-Biotin	7,8	mg
Nicotinsäure	15,6	mg
Liponsäure	15,6	mg
Folsäure	15,6	mg
→ A. bidest ad 1 l		

**Tabelle 23: 200 x Vitamin Mix B**

Chemikalien	Menge	
Panhotenat	15,6	mg
Pyridoxin	15,6	mg
Thiamin	15,6	mg
4-Aminobenzoessäure	15,6	mg
Cobalamin	0,32	mg
→ A. bidest ad 1 l		

Alle aufgeführten Nährmedien wurden in einem Autoklaven bei 121°C mit A. bidest für 60 min sterilisiert. Hitzesensitive Bestandteile wurden steril-filtriert.

### 6.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur erfolgte photometrisch durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm. Als Blindwert diente dabei das nicht beimpfte Wachstumsmedium. Bei einer OD<sub>578</sub> größer als 0,5 erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Bakteriensuspension. Eine OD<sub>578</sub> von 1 entspricht ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/ml (371).

### 6.2.4. Herstellung chemisch kompetenter Zellen (372)

Aus einer Übernachtskultur von *E.coli*-Zellen wurden 100 ml LB auf eine OD<sub>578</sub> von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde auf eine OD<sub>587</sub> von 0,6 angezogen und 20 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C und 4000 x g für 20 Minuten abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem Puffer 1 resuspendiert. Es folgte ein weiterer 20 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4000 x g. Das dabei entstehende Pellet wurde mit 5 ml eiskaltem Puffer 1 gewaschen und anschließend erneut wie beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Puffer aufgenommen und 150 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

**Tabelle 24: Lösung 1 für die Herstellung komp. Zellen**

Chemikalien	Endkonzentration	
CaCl <sub>2</sub>	100	mM

**Tabelle 25: Lösung 2 für die Herstellung komp. Zellen**

Chemikalien	Endkonzentration	
CaCl <sub>2</sub>	100	mM
Glycerin	10	%

### 6.2.5 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

2 µl einer Plasmidlösung oder 10 µl des Ligationsgemisches wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend in ein Eisbad gestellt. Es wurden 75 µl chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gelegt und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt, bevor 200 µl LB-Medium

hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden für 60 Minuten bei 37°C aerob inkubiert und auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausplattiert.

### 6.2.6 Triparental Mating

Der Transfer von Plasmiden aus dem Rif<sup>S</sup> *E. coli*-Stamm DH5α in den Rif<sup>R</sup> *R. pomeroyi* Stamm J470 wurde mit Hilfe von Triparental Mating Experimenten (Konjugation) erreicht. Ein *E. coli* DH5α-Stamm mit dem Helferplasmid pRK2013 (Abschnitt 4.5), der *E. coli* DH5α-Stamm, welcher das zu transferierende Plasmid trug und der *R. pomeroyi*-Wildtypstamm J470 wurden in ihren entsprechenden Vollmedien über Nacht bei 30°C bis zum Eintritt in die stationäre Phase kultiviert. Dabei wurden den Medien keine Antibiotika zugesetzt. Durch Zentrifugation (4000 x g) wurden Zellpellets von je 1 ml jeder *E.coli* Kultur und 2 mL *R. pomeroyi* J470 Kultur gemeinsam in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß geerntet, im verbleibenden Medium resuspendiert und dabei durchmischt. Die Zellsuspension wurde auf steriles 595 ½ S & S Filterpapiere (Schleicher & Schuell, Deutschland) pipettiert und auf Basalmediums-Agarplatten bei 30°C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 1/2 YTSS aufgenommen und 10- und 100-µl-Aliquots auf 1/2 YTSS Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30 ° C inkubiert. Die *R. pomeroyi* DSS-3 Kolonien wurden dann auf ihre gewünschte Antibiotika-Resistenz/-Sensitivität getestet. Dieses Verfahren wurde sowohl für die Plasmide verwendet, die in *R. pomeroyi* DSS-3 replizieren können (Derivate des *lacZ*-Fusionsvektor pBIO1878), als auch jene, die ins Genom integrieren (Derivate des Suizid-Vektors pK18mobsacB). Die *R. pomeroyi* J470 Stämme, welche Derivate des replikativen Plasmids pBIO1878 tragen, sind Rif<sup>R</sup> und Spec<sup>R</sup>. Mutanten, die von *R. pomeroyi* J470 abgeleitet sind und chromosomale Deletionen tragen, sind Rif<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup> (Anwesenheit der chromosomalen Insertion) aber Kan<sup>S</sup> (Verlust des pK18mobsacB Rückgrads).

### 6.2.7 Mechanischer Zellaufschluss

#### 6.2.7.1 Zellaufschluss in einem diskontinuierlichem Hochdruck-Homogenisator (French Press)

Die French Press wurde 1950 entwickelt (373) . Die Methode beruht auf der starken Verformung von Bakterienzellen unter hohem Druck und der anschließenden Dekompression dieser. Die Bakterienzellwand kann den entstehenden Scherkräften und Kavitationseffekten nicht standhalten und platzt.

Für diese Art des Zellaufschlusses wurden die Zellen in 30 ml Waschpuffer (Abschnitt 4.2.9.2) resuspendiert, in die gekühlte French-Press-Kammer gegeben und anschließend ein Druck von 900 psi (das entspricht 6205,28 kPa) aufgebaut. Nach Öffnung des Ablassventils konnte die Probe tropfenweise in einem gekühlten Falcon aufgefangen werden. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Anschließend wurde das Zellysate für 30 min bei 4°C und 35.000 x g zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 6.2.7.2 Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators

In einem Ultraschallhomogenisator werden mechanische Schwingungen erzeugt, welche auf das Medium übertragen werden. Kavitationserscheinungen im Bereich unmittelbar vor der Sonde sind die Folge. Bei einer kritischen Größe von 150 µm implodieren die Kavitationsblasen und setzen dabei Wirbel mit hoher Scherkraft frei (374). Die bakterielle Zellwand wird als Folge dieser zerstört.

Das Zellpellet wurde in 30 ml Waschpuffer resuspendiert (Abschnitt 4.2.9.2). Der mit einer Titan-Sonde (12 mm Durchmesser) ausgestattete Ultraschallprozessor wurde zunächst mit Wasser und anschließend mit Ethanol gereinigt, um alte Zellrückstände zu entfernen. Die Sonde wurde etwa 5 mm tief in die Probe gehalten. Die Ultraschallfrequenz wurde bei 54 W erzeugt und hatte eine Impulsfrequenz von 0,7 Sekunden. Zur Vermeidung von Überhitzung der Probe befand sich das Falcon stets in einem Eisbad. Zusätzlich wurden zwischen den Aufschlussvorgängen Pausen von einer Minute eingehalten.

## 6.2.8 Arbeiten mit DNA

### 6.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Genomabschnitte wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet (375). Die Durchführung erfolgte nach Standardprotokoll (376) unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase. Chromosomale DNA oder Plasmid-DNA diente als Matritzen-DNA.

**Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Phusion-Polymerase PCR**

Chemikalien	Endkonzentration	
5 x Phusion HF Puffer	1x	
dNTPs	200	µM jedes dNTPs
forward primer	10	pM
reverse Primer	10	pM
template DNA (20-40 ng/µl)	2,5	µl
Phusion DNA Polymerase → A. bidest ad 50 µl	2	U

**Tabelle 27: Reaktionsverlauf der Phusion-Polymerase PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Cyclen
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	1
Denaturierung	98°C	10 sec	} 35
Annealing	T <sub>m</sub> + °C	20 sec	
Elongation	72°C	15 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

### 6.2.8.2 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden 0,8 % (w/v) oder 2 % (w/v) Agarosegele verwendet (371). Im Mikrowellenherd wurde die Agarose in TBE-Puffer vollständig gequollen und bis zur weiteren Verwendung bei 60°C aufbewahrt. Die nach dem Gießen gehärteten Gele wurden in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die vorgesehenen Geltaschen gegeben. Ein geeigneter Größenstandard wurde ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Das interkalierende Agens Ethidiumbromid ermöglichte nach dem Lauf die Sichtbarmachung der DNA-Stränge mittels UV-Strahlung auf dem Gel Jet Imager.

**Tabelle 28: DNA-Probenpuffer**

Chemikalien	Menge	
Glycerin	5,0	ml
Bromphenolblau	5,0	mg
Xylencyanol	5,0	mg
→ ad 5 ml 1-fach TBE, pH 8,3		

### 6.2.8.3 Isolation von DNA aus DNA-Agarosegelen

Der gesamte PCR- bzw. Restriktionsansatz wurde mit 1 x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 0,8 % bzw. 2 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden 2 µl desselben Ansatzes in einer benachbarten Geltasche als Kontrollspur mitgeführt. Die Kontrollspur und der Größenstandard wurden nach dem Lauf vom Rest des Gels getrennt. Dadurch konnten die gesamte PCR-Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten werden, ohne sie vorher mittels UV-Bestrahlung zu visualisieren. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung aus dem Gel entsprechend der Vorschrift des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen.

### 6.2.8.4 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

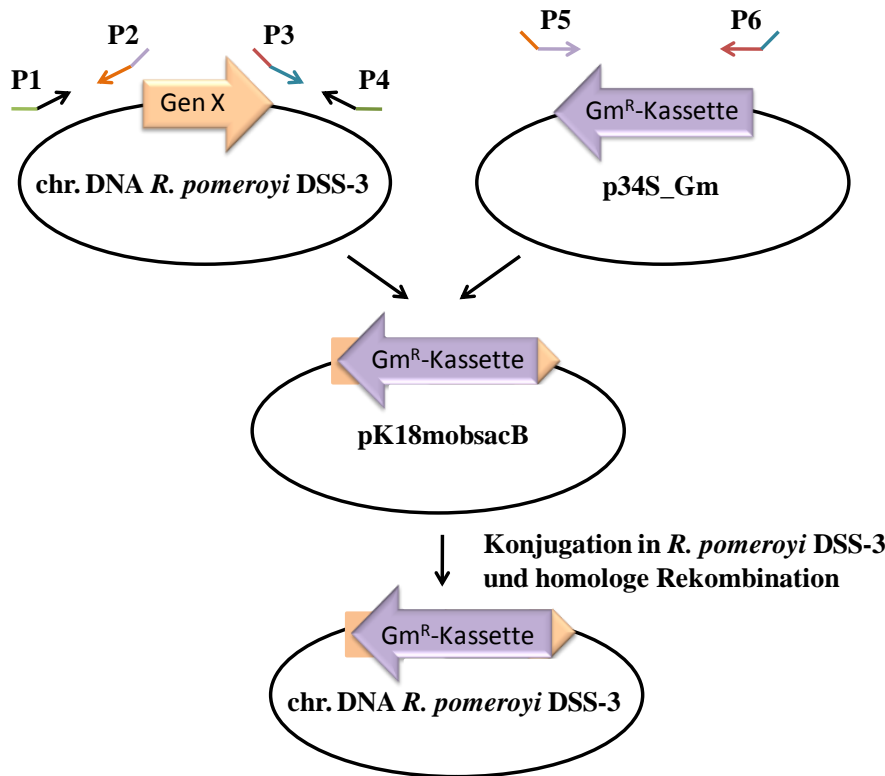
Grundlage der Mutantenkonstruktion waren genspezifische Primer, die der Amplifikation des gewünschten Abschnitts der chromosomalen DNA aus *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 diene. Sowohl am forward-, als auch am reverse Primer wurden Schnittstellen für eine Restriktionsendonuklease angefügt. Nach der Durchführung einer PCR mit der Phusion-Polymerase wurden die DNA-Fragmente aus einem Agarosegel aufgereinigt. Der Zielvektor wurde ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen restringiert. Um eine Re-Ligation des linearisierten Vektors zu verhindern, wurde dieses für 1,5 Stunden bei 37°C mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die anschließende Ligation von Vektor und PCR-Produkt mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die eingesetzten Enzyme- und DNA-Mengen und die Auswahl des Puffers entsprachen den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot). Im finalen Schritt wurde der Ligationsansatz für 10 min zu 37°C gestellt, um noch nicht vollständig ligierte Abschnitte zu verbinden.

### 6.2.8.5 Konstruktion von Plasmiden

Die transkriptionellen *lacZ*-Reporterfusionenplasmiden pBAS19, pBAS20 und pBAS21 wurden wie folgt konstruiert. Für pBAS19 ( $P_{enuR}$ -*lacZ*) wurden 1097 bp stromaufwärts von *enuR* und die ersten 66 Basenpaare des *enuR*-Gens (Abb. 3) mittels Phusion DNA-Polymerase und den DNA-Primern *lacZenuR\_up\_for* und *lacZenuR\_PstI\_rev* (Abschnitt 4.4) von genomischer *R. pomeroyi* DSS-3 -DNA amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit Hilfe des High Pure PCR product Purification Kits (Abschnitt 4.1.3) gereinigt und mit EcoRI und PstI (Abschnitt 4.1.5) entsprechend der Herstellerempfehlung restriktionsverdaut. Diese wurden in den entsprechend linearisierten *lacZ*-Fusionsvektor pBIO1878 (43) legiert. Gleichmaßen wurde für die Konstruktion von pBAS20 und pBAS21 verfahren. Das chromosomale 0,5 kb DNA-Fragment in pBAS21 ( $P_{uehA}$ -*lacZ*) umfasst 308 bp des 5'-Endes des *enuR*-Gens, die 97 bp *enuR-uehA* intergene Region und 28 bp des *uehA* Gens (Abb. 3). Dieses DNA-Fragment wurde mit Hilfe des *lacZuehA\_EcoRI\_for* und *lacZuehA\_PstI\_rev* Primers (Abschnitt 4.4) amplifiziert. Für die Amplifikation des DNA-Fragments für die Konstruktion von pBAS20 wurden die Primer *lacZenuR\_up\_for* und *lacZuehA\_PstI\_rev* (Abschnitt 4.4) verwendet. Das Plasmid enthält daher ein Insert (2.617 bp), bestehend aus 1097 bp stromaufwärts von *enuR*, dem gesamten *enuR*-Gen, die 97 bp *enuR-uehA* intergene Region und 28 bp des *uehA* Gens (Abb. 3)

Zur Konstruktion der  $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$  (Stamm ASR6),  $\Delta(enuR::Gm)1$  (Stamm ASR7),  $\Delta(eutD::Gm)1$  (Stamm ASR8),  $\Delta(ntrXY::Gm)1$  (Stamm ASR9),  $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$  (Stamm ASR10),  $\Delta(eutABC::Gm)1$  (Stamm ASR11),  $\Delta(eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$  (Stamm ASR12) und  $\Delta(ssd-atf::Gm)1$  (Stamm ASR14) Mutanten des *R. pomeroyi* Stamms J470 wurden 600 bp Fragmente stromaufwärts und stromabwärts der jeweiligen genomischen Bereiche (Abb. 3) durch PCR unter Verwendung von benutzerdefinierten Primern (Abschnitt 4.4) amplifiziert. Eine Gentamycin-Resistenzkassette wurde von p34S\_Gm (377) (Abschnitt 4.5) amplifiziert. Die drei zusammengehörigen DNA-Fragmente wurden in den Suizid-Vektor pK18mobsacB (linearisiert mit EcoRI / XbaI) gemäß dem Gibson-Verfahren (378) kloniert. Dabei entstanden die in Abschnitt 4.5 aufgeführten Plasmide. Die  $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ -Deletion umfasst das gesamte Gencluster des Ectoin- und 5-Hydroxyectoin-Katabolismus (14220 bp). Die  $\Delta(enuR::Gm)1$ -Deletion entfernt 975bp (entspricht den Aminosäuren 1-325 von EnuR) aus dem *R. pomeroyi* DSS-3 Chromosom. Die  $\Delta(eutABC::Gm)1$ -Mutation umfasst die 2775 bp zwischen dem ATG-Startcodon von *eutA* und dem TGA-Stoppocodon von *eutC*. Die  $\Delta(eutD::Gm)1$ -Deletion umspannt das gesamte *eutD*-Gen (1188 bp). Die  $\Delta(ntrXY::Gm)1$ -Mutante entfernt die überlappenden Gene *ntrY* und *ntrX* (3.695 bp) aus dem bakteriellen Genom. Die  $\Delta(asnC-ssd-atf::Gm)1$ -Mutation entfernt 3.611 bp, beginnend am ATG-Startcodon von *asnC* und endend beim TGA-Stoppocodon von *atf*. Die  $\Delta(ssd-atf::Gm)1$ -Deletion umfasst die DNA-Sequenz vom ATG des *ssd*-Gens bis zum TGA von *atf* (3004 bp). Im  $\Delta(eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ -Stamm sind 8603 bp aus dem Operon entfernt, am ATG von *eutA* beginnend und bei TGA von *atf* endend.





**Abbildung 42: Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante in *R. pomeroiy* DSS-3**

Schematische Darstellung zur Konstruktion einer Gendeletion in *R. pomeroiy* DSS-3. Die Lage der verschiedenen Primer, die zur Amplifikation der 5' Flanke, 3' Flanke sowie der Antibiotika-Kassette benötigt werden, sind gekennzeichnet- Die drei entstehenden Fragmente werden mit Hilfe des Gibson-Assemblys in den pK18mobsacB-Vektor legiert. Das entstehende Plasmid wurde in *R. pomeroiy* DSS-3 konjugiert.

Für die Konstruktion eines Expressionsplasmids für das *R. pomeroiy* DSS-3 EnuR-Protein wurde das entsprechende Gen aus *R. pomeroiy* DSS-3 für die Expression in *E. coli* codonoptimiert (GenBank accession number KU891821) und synthetisch hergestellt (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Das synthetische Gen wurde aus dem vom Lieferanten bereitgestellten Plasmid über eingefügte SfiI-Restriktionsschnittstellen befreit und mittels LglI-Restriktion und anschließende Ligation in den Donorvektor pENTRY-IBA20 (Göttingen, Deutschland IBA GmbH) kloniert. Das resultierende Plasmid pBAS2 (Abschnitt 4.5) wurde entsprechend des IBA-Gate-Klonierungssystems mit Esp3I restringiert und gleichzeitig in den Expressionsvektor pASG-IBA3 ligiert. In dem resultierenden Plasmid pBAS3 wird das 3'-Ende der Sequenz an ein kurzes DNA-Fragment fusioniert, welches für die zehn Aminosäuren des *Strep*-Tag-II Affinitätspeptids kodiert. Die Expression des rekombinanten Gens in pBAS3 wird durch den TetR gesteuerten tet-Promotor auf dem Rückgrad des pASG-IBA3 Plasmids vermittelt.

Um die kovalente Bindung des Pyridoxal-5'-Phosphats im EnuR-Protein nachzuweisen, wurde mittels site-directed mutagenesis ein Codonaustausch in die Plasmide pBAS3 und pBAS20 eingeführt. Unter Zuhilfenahme des QuikChange Lightning Kits (Stratagene, La Jolla, CA) und spezifischen Primern (Microsynth, Lindau, Deutschland) wurde Lysinrest 302 in der Aminosäuresequenz von EnuR in einen Histidinrest [AAA → CAT] umgewandelt. Die dabei entstandenen Plasmide wurden mit pBAS17 (aus pBAS3) und pBAS23 (aus pBAS20) bezeichnet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 57 aufgeführt.

Die korrekte Nukleotidsequenz aller erstellter Plasmide und Mutationen wurde mittels Next Generation Sequencing Analysen durch den Service von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) verifiziert.

### 6.2.8.6 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte gemäß der Anleitung des High Pure Plasmid Isolation Kits von Roche. Von der Säule eluiert wurde, jedoch mit doppelt destilliertem Wasser, anstatt mit der im Kit enthaltenen Pufferlösung. Eine Agarosegelelektrophorese gab Aufschluss über Qualität und Quantität der Isolation. Die Plasmide wurden bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert.

### 6.2.8.7 Isolation chromosomaler DNA aus *R. pomeroyi* DSS-3 (379)

Für die Isolation chromosomaler DNA aus *R. pomeroyi* DSS-3 wurden 2 ml einer Übernachtskultur in einem Eppendorfgefäß für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 1 x TE-Puffer gewaschen und nach erneuter Pelletierung in 300  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. Es wurden 30  $\mu$ l einer Lysozymlösung (20 mg/ml) hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz invertiert und im Anschluss für 10 min bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden 100  $\mu$ l 10 % (w/v) SDS und zur Proteinpräzipitation 100  $\mu$ l 5 M Natriumperchlorat hinzugefügt. Um Proteine und Nukleinsäuren zu separieren, wurden 500  $\mu$ l eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Das Gemisch wurde ausgeschüttelt und anschließend die Phasentrennung durch Zentrifugation (21.900 x g, 5 min) herbeigeführt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 800  $\mu$ l 98 % (v/v) kaltem Ethanol die chromosomale DNA ausgefällt. Diese wurde mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 750  $\mu$ l 70 % (v/v) Ethanol gegeben und durch erneute Zentrifugation (15 min, 21.000 x g, 4°C) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100  $\mu$ l TE-Puffer bei 65°C gelöst. Qualität und Quantität der Isolation wurde in einem Agarosegel überprüft. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

### 6.2.8.8 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität von DNA erfolgte über eine spektrophotometrische Messung mit dem Nanodrop. Dabei wurden die Absorptionen bei 260 nm, 280 nm und 230 nm sowie die Koeffizienten A260/A280 und A260/A230 bestimmt. Unter der Annahme, dass bei einer OD260

von 1 ungefähr 50 µg/ml doppelsträngige DNA vorliegen, sollte der Koeffizient aus A260 und A280 zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte außerhalb dieser Vorgabe deuten auf Proteinverunreinigungen der DNA hin. Der Koeffizient aus A260 und A230 sollte unter 2,0 liegen, da höhere Werte einen Hinweis auf eine Kontamination der DNA mit Phenol oder anderen organischen Lösungsmitteln darstellen (371).

### 6.2.9 Arbeiten mit Proteinen

#### 6.2.9.1 Überproduktion von Proteinen

Der *E. coli* B-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem pBAS3 bzw. pBAS17 Plasmid transformiert. Eine Vorkultur des entsprechenden Stammes wurde über Nacht unter Zugabe von Ampicilin (Abschnitt 4.1.4) kultiviert und in 1 x MMA (273) überimpft ( $OD_{578} = 0,05$ ). Die Zellen wurden bei 37°C und 220 rpm in einem Luftschüttler kultiviert, bis die mittleren logarithmischen Phase ( $OD_{578} \sim 0,6$ ) erreicht wurde. Die Expression des *enuR*- bzw. des *enuR*<sup>\*</sup>-Gens wurde durch die Zugabe des Induktors des TetR-Repressor, Anhydrotetracyclin (AHT), bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg ml<sup>-1</sup> in das Wachstumsmedium induziert. An diesem Punkt wurde die Wachstumstemperatur auf 35°C gesenkt und die Zellen für weitere 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (20 min bei 4°C, 5000 rpm) von dem Wachstumsmedium abgetrennt und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 6.2.9.2 Strep-Tag II Affinitäts-Chromatographie

Für die Reinigung der rekombinant überexprimierten Proteine wurden die Zellen in Waschpuffer resuspendiert und mittels FrenchPress und Ultraschallhomogenisator lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 35.000 rpm und 4°C entfernt. Das geklärte Zelllysate wurde über eine Strep-TactinSuperflow Säule geleitet, welche mit Waschpuffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 5 Bettvolumen Waschpuffer gespült und das gebundene Strep-Tag II-Proteine anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Die Reinheit des gereinigten EnuR-Strep-Tag-II-Protein und seines Derivats wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung von 12 % Polyacrylamidgelen untersucht.

**Tabelle 29: Waschpuffer für die Affinitäts-Chromatographie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	100	mM
NaCl	150	mM

**Tabelle 30: Elutionspuffer für die Affinitäts-Chromatographie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	100	mM
NaCl	150	mM
Desthiobiotin	5	mM

**Tabelle 31: Regenerationspuffer für die Affinitäts-Chromatographie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	100	mM
NaCl	400	mM
HABA	1	mM

### 6.2.9.3 Einengen der Proteinlösung

Für die Durchführung eines Gelfiltrationsexperiments wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingengt. Der Filter wurde zunächst mit 4 ml Aqua dest. befüllt und durch Zentrifugation bei 5.000 x g und 4°C gereinigt. Die Proteinlösung wurde dann bei 5.000 x g und 4°C so lange zentrifugiert, bis eine ausreichend hohe Proteinkonzentration erreicht wurde, ohne dass das Protein auf der Säule ausfiel.

### 6.2.9.4 Größenausschlusschromatographie

Die quaternäre Struktur des isolierten EnuR-*Strep*-Tag-II-Proteins und seines Derivates EnuR\* in Lösung wurde durch Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht. Für diese Experimente wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mit einem ÄKTA pure 25 L-System (GE Healthcare Europe GmbH) verbunden. Zur Äquilibration der Säule wurden 150 ml des unten genannten Puffers über diese geleitet und anschließend 6 mg des Proteins auf die Säule geladen. Um die Leistung der Größenausschluss-Säule zu standardisieren, wurde eine Proteinlösung, bestehend aus jeweils 3 mg ml<sup>-1</sup> von Carboanhydrase (aus Rindererythrozyten) (29 kDa), Albumin (aus Rinderserum) (66 kDa) und Alkohol Dehydrogenase (aus *Saccharomyces cerevisiae*) (150 kDa), verwendet (Gelfiltrations Marker Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Säulenläufe der *Strep*-Tag-II-Fusionsproteine und der Markerproteine wurden mit dem Einhorn 6.3-Software-Paket (GE Healthcare Europe GmbH) ausgewertet und die quaternäre Zusammensetzung der EnuR-Proteine in Lösung berechnet.

**Tabelle 32: Puffer für die Größenausschlusschromatografie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	10	mM
NaCl	150	mM

### 6.2.9.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen von EnuR und EnuR\* wurden durch eine spektrophotometrische Messung mit Hilfe des Nanodrop bestimmt. Dabei wurden die Absorptionen bei 280 nm gemessen und die Proteinkonzentration mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Über das ProtParam Tool des Expasy Servers (284) wurden dazu die molaren Massen der Proteine und ihre Extinktionsfaktoren bestimmt. Diese wurden für die Berechnung der Proteinkonzentration im Gerät angegeben. Für EnuR ergab sich dabei eine molare Masse von 51,986 kDa und ein molarer

Extinktionskoeffizient von  $64,775 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Für die EnuR (Lys-302/His)-Mutante EnuR\* wurde eine molare Masse von 51,977 kDa und ein molarer Extinktionskoeffizient von  $64,775 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  errechnet.

### 6.2.9.6 1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)

Die Proteinprobe wurde mit fünffachem SDS-Probenpuffer versetzt und bei  $90^\circ\text{C}$  für 10 min denaturiert. Durch die gleichmäßige Anlagerung von SDS können die Proteine dann unabhängig von ihrem Masse-/Ladungsverhältnis und ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Ein Proteinmarker (Tabelle 4.1.5) wurde in der ersten Geltasche mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei 100 V bis die Laufront das untere Gelende erreicht hatte. Danach wurde das Gel für mindestens 20 min mit Coomassie gefärbt und im Anschluss mit Entfärbter von überschüssigem Farbstoff befreit.

**Tabelle 33: Zusammensetzung von Trenngelen (380)<sup>1</sup>**

Chemikalien	6 %ig	10 %ig	12 %ig	15 %ig
A.bidest	5,35 ml	4,02 ml	3,35 ml	2,35 ml
1,5 M Tris/HCl pH 9,1	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
10 % SDS	104 µl	104 µl	104 µl	104 µl
30 % Acrylamid	2 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml
10 % APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Für die Erstellung von nativen Polyacrylamidgelen wurde kein SDS zugesetzt und auf das Sammelgel verzichtet.

**Tabelle 34: Zusammensetzung eines 4%igen Sammelgels (380)**

Chemikalien	Menge
A.bidest	6,1 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,6 ml
10 % SDS	104 µl
30 % Acrylamid	1,3 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	20 µl

<sup>1</sup>angegebene Volumina ausreichend für 1 SDS-Polyacrylamid-Gel

**Tabelle 35: 4-fach 1D-SDS-Probenpuffer**

Chemikalien	Menge
1 M Tris-HCl pH 6,8	3 ml
20 % SDS	1,5 ml
β-Mercaptoethanol	0,3 ml
Glycerin	3 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

**Tabelle 36: 5-fach SDS-Laufpuffer**

Chemikalien	Menge
Tris (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

#### 6.2.9.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für das Elektrophoretic Mobility Shift Assay wurden ein 433 bp Fragment und ein 200 bp Fragment upstream von *uehA* amplifiziert und gereinigt. In einem 15 µl-Ansatz wurden 10 nmol<sup>-1</sup> DNA ohne und mit ansteigenden Konzentrationen (0,02 µM bis 0,4 µM) von aufgereinigtem EnuR-*Strep*- und EnuR\*-*Strep*-Protein bei 4°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl SDS-freiem Probenpuffer versetzt und auf ein natives 6 % Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für etwa 105 min. Das Gel wurde in ein Ethidiumbromidbad gelegt und die DNA anschließend mittels des Gel Jet Imager sichtbar gemacht und fotografiert.

**Tabelle 37: Puffer für das EMSA**

Chemikalien	Endkonzentration
Tris(pH 7,5)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Dithiotreitol (DTT)	1 mM
BSA	30 µg/ml
HerringSperm DNA	50 µg/ml
Glycerol	5 %
Tween	0,1 %

#### 6.2.9.8 Microscale thermophoresis (MST)

Für das MST Experiment wurde das Protein (EnuR oder EnuR\*) mit Hilfe des Monolith NT<sup>TM</sup> Protein Labeling Kit RED (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) mit dem Farbstoff NT-647, wie vom Hersteller angegeben, markiert. Da dieser Schritt durch Amine im Medium unterbunden wird, musste das labile Protein EnuR bzw. EnuR\* für diese Markierung aus dem Reinigungspuffer in den ‚Labeling Buffer‘ des Monolith NT<sup>TM</sup> Protein Labeling Kit RED umgepuffert und im Anschluss wieder in seinem ursprünglichen Reinigungspuffer zurückgepuffert werden. Anschließend wurden 65 µM des markierten Proteins mit schrittweisen Verdünnungen (ausgehend von 200 nM bzw. 1 µM) der zu untersuchenden Liganden (α-Acetyl-N-2,4-Diaminobutyrat; γ-Acetyl-N-2,4-Diaminobutyrat; Ectoin; 5-Hydroxyectoin) titriert. Die Bindungsstudien wurden mit dem Monolith NT.015 (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) bei 21°C (LED power – 100 %, IR laser power – 75 %) durchgeführt. Zwei unabhängige Experimente wurden bei 680 nm aufgenommen und die Daten mit der Nano Temper Analysis 1.2.009 und Origin 8G Software ausgewertet, um den K<sub>d</sub>-Wert zu berechnen.

**Tabelle 38: Reinigungspuffer für die Thermophorese**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	100	mM
NaCl	150	mM

**Tabelle 39: MST-Puffer für die Thermophorese**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	10	mM
NaCl	150	mM
Tween	0,2	%

#### 6.2.9.9 Circular-Dichroism Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden mit 3,5 µM Protein (EnuR und EnuR\*) in 5 mM Tris (pH 7,5) mit 75 mM NaCl aufgenommen.

**Tabelle 40: Puffer für die CD-Spektroskopie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	10	mM
NaCl	150	mM
Tween	0,2	%

#### 6.2.9.10 UV/Vis-Spektroskopie

Für die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums von EnuR und EnuR\* wurde eine 20 µM Proteinlösung im angegebenen Puffer in eine Quarzküvette gegeben und im Genesys 10S UV/Vis-Spektrophotometer ein Spektrum zwischen 250 und 500 nm aufgenommen.

**Tabelle 41: Puffer für die UV/VIS-Spektroskopie**

Chemikalien	Endkonzentration	
Tris(pH 7,5)	100	mM
NaCl	150	mM

#### 6.2.9.11 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde nach der Methode von Miller (273) durchgeführt. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid in Galaktose und o-Nitrophenol durch die β-Galaktosidase. o-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann bei einer Wellenlänge von 420 photometrisch quantitativ bestimmt werden. Die Expression des Reportergens *lacZ* unter der Kontrolle der Promotorregion des *enuR*- oder *uehA*-Gens wurde nach dem Wachstum der entsprechenden Bakterienkulturen in Basalmedium mit entweder Glucose und NH<sub>4</sub>Cl oder Ectoin bzw. 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gemessen. Für solche Deletionsmutanten, die kein Wachstum auf Ectoin oder 5-Hydroxyectoin mehr zeigten, wurden

dem Medium neben Ectoin oder 5-Hydroxyectoin auch Glucose (28 mM) als Kohlenstoffquelle zugesetzt.

Für den Enzymtest wurden die Stämme bis zu einer  $OD_{578}$  von 1,0 - 1,2 kultiviert. Dreimal 1,5 ml jeder Kultur wurden abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Pellets wurden in je 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert und die  $OD_{578}$  im Z-Puffer bestimmt. 200 µl der Zellsuspension wurden mit 800 µl Z-Puffer gemischt und anschließend mit 100 µl Chloroform und 50 µl 0,1 % SDS versetzt. Die Probe wurde 30 sec gevortext und 5 min bei 28°C inkubiert. Unter Beachtung der Zeit wurde die Lösung mit ONPG-Lösung versetzt und bei 28°C inkubiert, bis sich eine deutliche Gelbfärbung einstellte. An diesem Punkt wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1M  $NaCO_3$  gestoppt, die Zeitspanne notiert und die Extinktion bei 420 nm und 550 nm gemessen. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Der Proteingehalt wurde über die optische Dichte ( $OD_{578}$ ) abgeleitet. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Miller Units lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Miller Units} = 1000 * [(OD_{420} - 1,75 * OD_{550})] / (T * V * OD_{578})$$

Dabei ist:

**$OD_{420}$**  die Extinktion von o-Nitrophenol bei 420 nm abzüglich des Blindwertes

**V** das Volumen des eingesetzten Zellextraktes in ml und

**T** die Reaktionsdauer vom Start durch Zugabe von  $\beta$ -ONPG bis zum Stoppen durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  in min

**Tabelle 42: Z-Puffer**

Chemikalien	Endkonzentration	
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	60	mM
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	40	mM
KCl	10	mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1	mM
→ pH 7		

**Tabelle 43: Kalium-Phosphat-Puffer**

Chemikalien	Endkonzentration	
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	0,06	M
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,04	M
→ pH 7		

**Tabelle 44: ONPG-Lösung**

Chemikalien	Endkonzentration	
ONPG	4	mg
→ Kalium-Phosphat-Puffer ad 1 ml		



### 6.2.10 Arbeiten mit RNA

#### 6.2.10.1 Isolation von der gesamten RNA aus *R. pomeroiy* DSS-3

Für die Präparation der gesamten RNA wurden Zellen von *R. pomeroiy* DSS-3 in Basalmedium bei 30°C bis in die frühe Log-Phase angezogen. Dabei wurden jeweils 28 mM Glucose, Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoffquelle genutzt. NH<sub>4</sub>Cl wurde als Stickstoffquelle zugesetzt. Die RNA wurde durch ein modifiziertes saures Phenol-Verfahren isoliert (381). Dafür wurde das Zellpellet in 800 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 1/10 Volumen 10 % SDS zugesetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei 65°C inkubiert, bis die Lösung klar und viskos wurde. Anschließend wurden 1/10 Volumen 1 M Natriumacetat (pH 5,2) hinzugegeben und das Gefäß mehrmals invertiert. Die Lösung wurde mit einem Volumen warmen Phenol (65°C) versetzt und für 6 min bei 65°C inkubiert. Zwischendurch wurde das Gefäß mehrfach invertiert. Die Lösung wurde 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die beschriebene Phenolextraktion wurde ein weiteres mal wiederholt. Der Überstand aus der zweiten Phenolextraktion wurde mit einem Volumenteil Chloroform versetzt und 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein sauberes Gefäß überführt und die Chloroformextraktion wiederholt. Der Überstand der zweiten Chloroformextraktion wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH5,2) und anschließend zwei Volumenteile eiskaltes Ethanol (> 98 %) versetzt. Die Lösung wurde eine Stunde bei 4°C inkubiert. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C bei 13.000 rpm. Das entstehende RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut wie beschrieben pelletiert. Die RNA wurde bei Raumtemperatur für wenige Minuten getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### 6.2.10.2 Transkriptions-Analysen durch Northern Dot Blot

Für die Northern Dot Blot Hybridisierung wurden verschiedene Konzentrationen (180 ng - 3 µg) der gesamten RNA aus *R. pomeroiy* DSS-3, die entweder auf 28 mM Glucose, Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als alleinige Kohlenstoffquelle gewachsen waren, auf eine Nylonmembran (NytranN; Schleicher & Schuell) in einer Dot Blot-Apparatur gegeben. Für die Detektion der spezifischen *R. pomeroiy* DSS-3-Gene wurde die gesamte RNA mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden bei 68°C hybridisiert und die Membran entsprechend der Herstellerangaben des Dig Northern Starter Kit weiterbehandelt. Digoxigenin-markierte antisense RNA-Sonden wurden unter Verwendung desselben Kits durch *in vitro* Transkription von PCR Produkten erstellt, welche die T7-RNA-Polymerasepromotorsequenz enthielten. Für die Quantifizierung der Intensität des Hybridisierungssignals wurde eine Storm860 Fluoreszenz-Imager und das Image Quant-Software-Paket (Amersham Pharmacia Biotech) genutzt.

**Tabelle 45: 20x SSC (DEPC)**

Chemikalien	Endkonzentration
NaCl	3 M
Natriumcitrat → pH 7	0,3 M

**Tabelle 46: Maleinsäurepuffer (DEPC)**

Chemikalien	Endkonzentration
Maleinsäure	100 mM
NaCl → pH 7,5	150 mM

**Tabelle 47: Waschpuffer (DEPC)**

Chemikalien	Endkonzentration
Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
Tween → pH 7,5	0,3 %

**Tabelle 48: Detektionspuffer**

Chemikalien	Endkonzentration
Tris(pH 9,5)	100 mM
NaCl	150 mM

**Tabelle 49: 10x MOPS-Puffer**

Chemikalien	Endkonzentration
MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM
→ pH 7	

Alle Lösungen, die mit DEPC markiert sind, wurden direkt mit 0,1 % DEPC versetzt und über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert.

### 6.2.11 Bioinformatische Analysen

Über den Web-Server des 'genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute' (<http://genome.jgi.doe.gov/>) (JGI) (292,293) wurden Proteinhomologe des EutD-Proteins (accession number: AAV94440.1) von *R. pomeroyi* DSS-3 gesucht. Dazu wurde der BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) des Servers genutzt (Suchdatum: 06.01.2016) und in Genomsequenzen von fertiggestellten und unfertigen hinterlegten Genomsequenzen gesucht. Mit Hilfe der Gennachbarschaftsanzeige (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>) des JGI-Web-Servers wurden diejenigen *eutD*-ähnlichen Gene ausgewählt, die mindestens zwei oder mehr der anderen *eutABCE-asnC-ssd-atf* katabolischen Gene in der direkten Umgebung auswiesen. Ein Aminosäure-Sequenzalignment der EutD-Orthologen wurde mit ClustalΩ (382) ausgeführt und für die Erstellung

eines phylogenetischen Stammbaumes verwendet. Dieser wurde mit Hilfe des online Servers Interactive Tree of Life (<http://itol.embl.de/>) (294) erstellt.

Die Genome dieser potentiellen Ectoin-Abbauer wurden auf das Vorhandensein weiterer Gene untersucht. Es wurde analysiert, ob und wie viele Gene für den potentiellen 5-Hydroxyectoin-Abbau vorhanden sind, ob und für welchen Ectoin-Transporter (UehABC, EhuABCD, TeaABC) kodiert wird, ob ein *enuR*- oder *asnC*-Regulator vorhanden ist oder im Gencluster zusätzliche Gene kodiert werden, denen bisher keine Funktion in dem Ectoin-Abbaucuster zugeordnet werden konnte ( $\gamma$ -Glutamyltransferase oder ein NADPH:Chinon-Reduktase). Eine zusätzliche BLAST-Suche (383) über den Web-Server des 'genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute' (<http://genome.jgi.doe.gov/>) (JGI) (292,293) wurde vorgenommen, um in den gefundenen Genomen die Anwesenheit von Genen für die Ectoin und 5-Hydroxyectoin Synthese (*ectABCD*) aufzuzeigen (6,91). Dafür wurde nach Proteinhomologen von EctC (accession number: AAY29688) und EctD (accession number: AAY29689) aus *Virgibacillus salexigens* gesucht.

### 6.3. Oligonukleotide

Tabelle 50: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
gntR_ingene_for	GTTTCAGCTGAGCAGCGAACGTGGTC	Forward Primer für die site-directed mutagenesis von pBAS3; Konstruktion von pBAS17
gntR_ingene_rev	CTAAATGCCGGACGGCTAATGCTCAGATC	Reverse Primer für die site-directed mutagenesis von pBAS3; Konstruktion von pBAS17
LacZenuR_up_for	GCGAATTCCTTCATGTTTCAGCGCCCTC	Forward PCR-Primer für die Klonierung von pBAS19 und pBAS20
LacZenuR_PstI_rev	GCCTGCAGGATCGGGCAGCCAATTTG	Reverse PCR-Primer für die Klonierung von pBAS19
LacZuehA_PstI_rev	GCCTGCAGCAAAGGTGAAAGTGATGGATTGA G	Forward PCR-Primer für die Klonierung von pBAS21
LacZuehA_EcoRI_for	GCGAATTCCGGAGCGATACGAAATCG	Reverse PCR-Primer für die Klonierung von pBAS21 und pBAS20
WT_Lys -> Ala_for	GATTTACCTCACGACTTTTACAGCATGCACCG TTTCCGGTTTG	Forward Primer für die site-directed mutagenesis von pBAS20; Konstruktion von pBAS23
WT_Lys -> Ala_rev	CAAACCGGAAACGGTGCATGCTGTAAAAGTC GTGAGGTAAATC	Reverse Primer für die site-directed mutagenesis von pBAS20; Konstruktion von pBAS23
NB_gntR_fw	GATTGATCGACGGCCAGGTTGG	Forward Primer für die Amplifikation des <i>enuR</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
NB_gntR_revT7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCAGCAGGAA CAGGACCTTGCGC	Reverse Primer für die Amplifikation des <i>enuR</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
NB_uehA_fw	TGGCTCAATCCATCACTTTCACC	Forward Primer für die Amplifikation des <i>uehA</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
NB_uehA_revT7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGACCTCGTCC AGATCCGAACAGG	Reverse Primer für die Amplifikation des <i>uehA</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
<i>NB_eutD_fw</i>	CTGGATCTTCTGATCGTCACAGACC	Forward Primer für die Amplifikation des <i>eutD</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_eutD_revT7</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCGCATCATA GATATCGGCCACC	Reverse Primer für die Amplifikation des <i>eutD</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_ssd_fw</i>	AACGCCTGGTGATGGAAGTGG	Forward Primer für die Amplifikation des <i>ssd</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_ssd_revT7</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCTGTGCAC ATAGGCCACCAG	Reverse Primer für die Amplifikation des <i>ssd</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_dddW_for</i>	CATTGACGCCGAAAACGTGCC	Forward Primer für die Amplifikation des <i>dddW</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_dddW_rev</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCCGTGCCAT GTTCCGCATC	Reverse Primer für die Amplifikation des <i>dddW</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>NB_atf_for</i>	GGAAAAGAAAAAGATCATCTCGCGC	Forward Primer für die Amplifikation des <i>atf</i> Genfragments für die <i>in vitro</i> Transkription mittels T7-RNA Polymerase
<i>deltaGF_up_for</i>	ACAGCTATGACATGATTACGCTTCATGTTTCAG CGCCCT	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS24-Plasmids
<i>deltaGF_up_rev</i>	GGCTTATGTCAATTCGAGCTGCCGTCCGATAC CCTAGC	Reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS24-Plasmids
<i>Gentamycin_GF_for</i>	GCTAGGGTATCGGACGGCAGCTCGAATTGAC ATAAGCC	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS24-Plasmids
<i>Gentamycin_GF_rev</i>	CTGATGTTGACACGCAGGTTAGGTGGCGGTA CTTGGG	Reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS24-Plasmids
<i>deltaGF_down_for</i>	CCCAAGTACCGCCACCTAACCTGCGTGTCAAC ATCAG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung des pBAS24-Plasmids

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
deltaGF_down_rev	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG CGCGCTGCTTTATCTGG	Reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung des pBAS24-Plasmids
deltaEnuR_ingene_up_for	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGCT GAAATGGCTATTGCAGGC	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
rev_deltaEnuR_ingene_up_rev	CCCAAGTACCGCCACCTAAGCAATACATGTAC AATTGAGTGACAC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
rev_Gentamycin_ingene_for:	GTGTCACCTCAATTGTACATGTATTGCTTAGGT GGCGGTACTTGGG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
rev_Gentamycin_ingene_rev:	CAGCCGAAGACGACAATCCAGCTCGAATTGA CATAAGCCTG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
rev_deltaEnuR_ingene_down_for	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTGGATTGTCGT CTTCGGCTG	forward Primer für die Amplifikation des Fragments in <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
rev_deltaEnuR_ingene_down_rev(XbaI)	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG CTTCGAAAGCATACCGCCAA	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments in <i>enuR</i> für die Klonierung des pBAS34-Plasmids
deltaeutD_up_for:	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGGT CTGCATCATCGGCGCAG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutD</i> für die Klonierung des pBAS35-Plasmids
deltaeutD_up_rev	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTGTGCTCGGTT CCTGATTGATCAAC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutD</i> für die Klonierung des pBAS35-Plasmids
Gentamicin_eutD_for	GTTGATCAATCAGGAACCGAGCACAGCTCGAA TTGACATAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS35-Plasmids
Gentamicin_eutD_rev	GAAATCGGGTTCTTCTGCATCGTTAGGTGGCG GTACTTGGG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS35-Plasmids
deltaeutD_down_for	CCCAAGTACCGCCACCTAACGATGCAGAAGA ACCCGATTTC	forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>eutD</i> für die Klonierung des pBAS35-Plasmids

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
deltaeutD_down_rev(XbaI)	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG CATTTCCTCGACCGCGGTG	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>eutD</i> für die Klonierung des pBAS35-Plasmids
deltaasnC/ssd_up_for:	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGCC GAGAAAATCGCCGATTACTTC	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>asnC</i> für die Klonierung des pBAS42-Plasmids
deltaasnC/ssd_up_rev:	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTGTCCGCCTCT CAGGCGC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>asnC</i> für die Klonierung des pBAS42-Plasmids
Gentamycin_asnC/ssd_for:	GCGCCTGAGAGGCGGACAGCTCGAATTGACA TAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS42-Plasmids
Gentamycin_atf/ssd_rev:	CCATGCAGGATGCGCCTGTTAGGTGGCGGTA CTTGGG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung der Plasmide pBAS42 und pBAS49
deltaatf/ssd_down_for:	CCCAAGTACCGCCACCTAACAGGCGCATCCT GCATGG	forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung der Plasmide pBAS42 und pBAS49
deltaatf/ssd_down_rev(XbaI)	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG CGGAGGTCATCCGCATCTCG	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung der Plasmide pBAS42 und pBAS49
deltaatf/ssd_up_for	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGGA GGCGGACCCATGCAACTG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>ssd</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltaatf/ssd_up_rev	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTGTTGTCCTCC TCGGGTCTTGACAG	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>ssd</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
Gentamycin_atf/ssd_for	CTGCAAGACCCGAGGAGGACAACAGCTCGAA TTGACATAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltaEutABC_up_for	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGCG GCACCATCATCACCTG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutA</i> für die Klonierung des pBAS44-Plasmids
deltaEutABC_up_rev	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTTTGTTTCCT AAACAACAAGTACAGGC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutA</i> für die Klonierung des pBAS44-Plasmids

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
Gentamycin_EutABC_for	GAAACGCCTGTACTTGTTGTTTAGGAAACCAA AGCTCGAATTGACATAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS44-Plasmids
Gentamycin_EutABC_rev	GGGTCTGCCATGTGCTCGGTTCTGATTGATT AGGTGGCGGTACTTGGG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS44-Plasmids
deltaEutABC_down_for	CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAAT CAATCAGGAACCGAGCACATG	forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>eutC</i> für die Klonierung des pBAS44-Plasmids
deltaEutABC_down_rev	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG GCCCCGATCATAGATATCGGC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>eutC</i> für die Klonierung des pBAS44-Plasmids
deltaEutA-atf_up_for	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGCG GCACCATCATCACCTG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutA</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltaEutA-atf_up_rev	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTTTGGTTTCCT AAACAACAAGTACAGGC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>eutA</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
Gentamycin_EutA-atf_for	GAAACGCCTGTACTTGTTGTTTAGGAAACCAA AGCTCGAATTGACATAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
Gentamycin_EutA-atf_rev	GGGTCTGCCATGTGCTCGGTTCTGATTGATT AGGTGGCGGTACTTGGG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltaEutA-atf_down_for	CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAAT CAATCAGGAACCGAGCACATG	forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltaEutA-atf_down_rev	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG GCCCCGATCATAGATATCGGC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>atf</i> für die Klonierung des pBAS49-Plasmids
deltantrXY_up_for	CACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGCG GGTCGACGATATCCCG	Forward Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>ntrX</i> für die Klonierung des pBAS41-Plasmids
deltantrXY_up_rev	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTGGTTGCCACC TGCTGCC	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments upstream von <i>ntrX</i> für die Klonierung des pBAS41-Plasmids



Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
Gentamycin_ntrXY_for	GGCACATCAGGATGAGGGCAGCAGGTGGCAA CCAGCTCGAATTGACATAAGCCTG	Forward Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS41-Plasmids
Gentamycin_ntrXY_rev	CCCGCAGGCTAGGGGCGCAACGCCTTCTTAC TCTTAGGTGGCGGTACTTGGG	reverse Primer für die Amplifikation der Gm-Resistenzkassette von p34S_Gm für die Klonierung des pBAS41-Plasmids
deltantrXY_down_for	CACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTA AGAGTAAGAAGGCGTTGCGC	forward Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>ntrY</i> für die Klonierung des pBAS41-Plasmids
deltantrXY_down_rev	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG GATGATGACCTTCATTCCCTGG	reverse Primer für die Amplifikation des Fragments downstream von <i>ntrY</i> für die Klonierung des pBAS41-Plasmids
<i>uehA</i> _up_for(gntR)	GACAAATTGGCTGCCCCGATCCCTCCG	Forward Primer für das Protein-Fishing
<i>uehA</i> _up_rev_Biotin	GAATTGGCCTCGATTTCTCTTTGAATTTCTGG G	Biotinilierter reverse Primer für das Protein Fishing

## 6.4 Plasmide

Tabelle 51: verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pK18mobsacB	Suicide vector für <i>R. pomeroiy</i> DSS-3 , Kan <sup>R</sup>	(384)
pBIO1878	Vector with <i>lacZ</i> -Reportergen	(43)
p34S_Gm	Plasmid mit Gentamycin (Gm)- Resistenzkassette	(377)
pRK2013	Helferplasmid für die Konjugation	(385)
pBAS2 <sup>1</sup>	synthetisches, codonoptimiertes <i>enuR</i> -Gene in pENTRY-IBA20 kloniert	diese Arbeit
pBAS3	synthetisches, codonoptimiertes <i>enuR</i> -Gene aus <i>R. pomeroiy</i> DSS-3 in pASG-IBA3 kloniert	diese Arbeit
pBAS17	pBAS3 mit Codonaustausch-Mutation (AAA/CAT) in <i>enuR</i> welches zum Austausch von Lys-302 mit His führt	diese Arbeit
pBAS19	Upstream Region (1.1 kbp) von <i>enuR</i> in pBIO1878	diese Arbeit
pBAS20	2.617 bp upstream von <i>uehA</i> in pBIO1878	diese Arbeit
pBAS21	500 bp upstream von <i>uehA</i> in pBIO1878	diese Arbeit
pBAS23	pBAS20 mit Codonaustausch-Mutation (AAA/CAT) in <i>enuR</i> welches zum Austausch von Lys-302 mit His führt	diese Arbeit
pBAS24	Flankierende Regionen des <i>enuR</i> -Operon und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS34	Flankierende Regionen der ersten 975 bp des <i>enuR</i> -Gens und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS35	Flankierende Regionen des <i>eutD</i> -Gens und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBAS41	Flankierende Regionen des <i>ntrY</i> (upstream)- und <i>ntrX</i> (downstream)-Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS44	Flankierende Regionen des <i>eutA</i> (upstream)- und <i>atf</i> (downstream)-Gens und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS45	Flankierende Regionen des <i>eutA</i> (upstream)- und <i>eutC</i> (downstream)-Gens und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS49	Flankierende Regionen des <i>ssd</i> (upstream)- und <i>atf</i> (downstream)-Gens und eine Gm <sup>R</sup> Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit
pBAS41	Flankierende Regionen des <i>ntrY</i> (upstream)- und <i>ntrX</i> (downstream)-Kassette in pK18mobsacB	diese Arbeit

<sup>1</sup>Die DNA-Sequenz des codonoptimierten *enuR*-Gens wurde in der GenBank des NCBI-Servers (386) unter dem Zugriffsschlüssel KU891821 hinterlegt.

## 6.5. Bakterienstämme

Tabelle 52: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ) <i>supE44</i> <i>thi-1gyrA69</i>	(371)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pLysS	F' <i>lon</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) mit Prophage DE3 (kodiert für T7 RNA Polymerase) und Plasmid pLysS (kodiert für T7-Lysozym und Cm <sup>R</sup> )	(367)
<i>Escherichia coli</i> top10	F [ <i>araD139</i> ] <sub>B/r</sub> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )169* $\Delta$ <i>lambda</i> <sup>-</sup> <i>e14- flhD5301</i> $\Delta$ ( <i>fruK-yeiR</i> )725 ( <i>fruA25</i> ) $\Delta$ <i>relA1 rpsL150(strR) rbsR22</i> $\Delta$ ( <i>fimB-fimE</i> )632( <i>::IS1</i> ) <i>deoC1</i>	(387)
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	Wildtyp	(14)
J470 <sup>1</sup>	Rif <sup>R</sup> Mutante des <i>R. pomeroyi</i> DSS-3 Wildtyps	(388)
ASR6 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR7 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>enuR::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR8 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>eutD::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR9 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>ntrXY::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR10 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>asnC-ssd-atf::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR11 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>eutABC::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR12 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm</i> )1	diese Arbeit
ASR14 <sup>1</sup>	$\Delta$ ( <i>ssd-atf::Gm</i> )1	diese Arbeit

<sup>1</sup>alle Stämme sind Derivate des Wildtyps *R. pomeroyi* DSS-3 (14)

---

## 7. Literaturverzeichnis

---

1. Gottschalk G. Bacterial Metabolism. Springer Science & Business Media; 2012. 371 p.
2. Vitousek PM, Howarth RW Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. Biogeochemistry. 1991; 13(2):87–115.
3. Howarth RW, Marino R. Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. Limnol Oceanogr. 2006; 51: 364–76.
4. Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. Eur J Biochem FEBS. 1985; 149(1):135–9.
5. Inbar L, Lapidot A. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled L-glutamate and <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. J Biol Chem. 1988; 263(31): 16014–22.
6. Widderich N, Höppner A, Pittelkow M, Heider J, Smits SHJ, Bremer E. Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. PloS One. 2014; 9(4): e93809.
7. Widderich N, Czech L, Elling FJ, Könneke M, Stöveken N, Pittelkow M, et al. Strangers in the archaeal world: osmostress-responsive biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine by the marine thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*. Environ Microbiol. 2015 ; 18(4): 1227–48.
8. Welsh DT. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. FEMS Microbiol Rev. 2000; 24(3): 263–90.
9. Hoffmann T, von Blohn C, Stanek A, Moses S, Barzantny H, Bremer E. Synthesis, release, and recapture of compatible solute proline by osmotically stressed *Bacillus subtilis* cells. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(16): 5753–62.
10. Young R, Wang I-N, Roof WD, Young R, Wang I-N, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. Trends Microbiol. 2000; 8(3): 120–8.
11. Booth IR, Miller S, Müller A, Lehtovirta-Morley L. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. Cell Calcium. 2015; 57(3): 140–50.
12. Halverson LJ, Jones TM, Firestone MK. Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress. Soil Sci Soc Am J. 2000; 64(5): 1630.
13. González JM, Covert JS, Whitman WB, Henriksen JR, Mayer F, Scharf B, et al. *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(5): 1261–9.
14. Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, et al. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. Nature. 2004; 432(7019): 910–3.

15. Schulz A, Stöveken N, Binzen IM, Hoffmann T, Heider J, Bremer E. Feeding on compatible solutes: a substrate-induced pathway for uptake and catabolism of ectoines and its genetic control by EnuR. *Environ Microbiol.* 2016: (submitted).
16. Kölling R, Lother H. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1985; 164(1): 310–5.
17. Yokoyama K, Ishijima SA, Clowney L, Koike H, Aramaki H, Tanaka C, et al. Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30(1): 89–108.
18. Pawlowski K, Klosse U, de Bruijn FJ. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol Gen Genet MGG.* 1991; 231(1): 124–38.
19. Wang D, Xue H, Wang Y, Yin R, Xie F, Luo L. The *Sinorhizobium meliloti* ntrX gene is involved in succinoglycan production, motility, and symbiotic nodulation on alfalfa. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(23): 7150–9.
20. Bouvier TC, del Giorgio PA. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol Oceanogr.* 2002; 47(2): 453–70.
21. Campbell BJ, Kirchman DL. Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J.* 2013; 7(1): 210–20.
22. Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol Oceanogr.* 2005; 50(5): 1697–706.
23. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95(12): 6578–83.
24. Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature.* 2002; 418(6898): 630–3.
25. Kassen R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J Evol Biol.* 2002; 15(2): 173–90.
26. Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, et al. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLOS ONE.* 2011; 6(9): e24570.
27. Brinkhoff T, Giebel H-A, Simon M. Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol.* 2008; 189(6): 531–9.
28. Buchan A, González JM, Moran MA. Overview of the marine roseobacter lineage. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(10): 5665–77.
29. Luo H, Moran MA. Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014; 78(4): 573–87.
30. Wagner-Döbler I, Biebl H. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60: 255–80.

31. Newton RJ, Griffin LE, Bowles KM, Meile C, Gifford S, Givens CE, et al. Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J.* 2010; 4(6): 784–98.
32. Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus antarctic Pack Ice. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(11): 6610–9.
33. Dang H, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(2): 467–75.
34. Miller TR, Belas R. Dimethylsulfoniopropionate metabolism by *Pfiesteria*-associated *Roseobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(6): 3383–91.
35. Taylor MW, Schupp PJ, Dahllöf I, Kjelleberg S, Steinberg PD. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol.* 2004; 6(2): 121–30.
36. Sowell SM, Abraham PE, Shah M, Verberkmoes NC, Smith DP, Barofsky DF, et al. Environmental proteomics of microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. *ISME J.* 2011 May;5(5):856–65.
37. González JM, Kiene RP, Moran MA. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(9): 3810–9.
38. Yi H, Lim YW, Chun J. Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* to the genus *Ruegeria* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(4): 815–9.
39. Christie-Oleza JA, Miotello G, Armengaud J. High-throughput proteogenomics of *Ruegeria pomeroyi*: seeding a better genomic annotation for the whole marine *Roseobacter* clade. *BMC Genomics.* 2012; 13(73): 1-13.
40. Rivers AR, Smith CB, Moran MA. An Updated genome annotation for the model marine bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *Stand Genomic Sci.* 2014; 9(11): 1-9.
41. Reisch CR, Moran MA, Whitman WB. Dimethylsulfoniopropionate-dependent demethylase (DmdA) from *Pelagibacter* ubique and *Silicibacter pomeroyi*. *J Bacteriol.* 2008; 190(24): 8018–24.
42. Todd JD, Curson ARJ, Kirkwood M, Sullivan MJ, Green RT, Johnston AWB. DddQ, a novel, cupin-containing, dimethylsulfoniopropionate lyase in marine roseobacters and in uncultured marine bacteria. *Environ Microbiol.* 2011; 13(2): 427–38.
43. Todd JD, Kirkwood M, Newton-Payne S, Johnston AWB. DddW, a third DMSP lyase in a model *Roseobacter* marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *ISME J.* 2012; 6(1): 223–6.
44. Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae MO, Warren SG. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature.* 1987; 326(6114): 655–61.
45. Kiene RP, Linn LJ, Bruton JA. New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *J Sea Res.* 2000; 43(3–4): 209–24.

46. Reisch CR, Stoudemayer MJ, Varaljay VA, Amster IJ, Moran MA, Whitman WB. Novel pathway for assimilation of dimethylsulphoniopropionate widespread in marine bacteria. *Nature*. 2011: 473(7346): 208–11.
47. Salgado P, Kiene R, Wiebe W, Magalhães C. Salinity as a regulator of DMSP degradation in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *J Microbiol Seoul Korea*. 2014: 52(11): 948–54.
48. Sweeney TE, Beuchat CA. Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am J Physiol*. 1993: 264(3): R469-480.
49. Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*. 1998: 170(5): 319–30.
50. Martin DD, Ciulla RA, Roberts MF. Osmoadaptation in archaea. *Appl Environ Microbiol*. 1999: 65(5): 1815–25.
51. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1998: 62(2): 504–44.
52. Kunte HJ. Osmoregulation in Bacteria: Compatible Solute Accumulation and Osmosensing. *Environ Chem*. 2006: 3(2): 94–9.
53. Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol*. 2000: 66(7): 3052–7.
54. Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev*. 2002: 26(1): 49–71.
55. Lanyi JK. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1974 : 38(3): 272–90.
56. Eisenberg, Wachtel and EJ. Structural Studies of Halophilic Proteins, Ribosomes, and Organelles of Bacteria Adapted to Extreme Salt Concentrations. *Annu Rev Biophys Chem*. 1987: 16(1): 69–92.
57. Oren A, Heldal M, Norland S, Galinski EA. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extrem Life Extreme Cond*. 2002: 6(6): 491–8.
58. da Costa MS, Santos H, Galinski EA. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1998: 61: 117–53.
59. Brown AD. Microbial water stress. *Bacteriol Rev*. 1976: 40(4): 803–46.
60. Bremer E, Kramer R, Krämer R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000: 126(17)
61. Cayley S, Lewis BA, Record MT. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 1992: 174(5): 1586–95.
62. Hoffmann T, Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J Bacteriol*. 201: 193(7): 1552–62.



63. Holtmann G, Bremer E. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol.* 2004; 186(6): 1683–93.
64. Kurz M. Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Syst.* 2008; 4(6): 1-14
65. Arakawa T, Timasheff SN. The stabilization of proteins by osmolytes. *J Biophys. Biophys J.* 1985; 47(3): 411–4.
66. Street TO, Bolen DW, Rose GD. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(38): 3997–4002.
67. Timasheff SN. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 41(46): 13473–82.
68. Lee JC, Timasheff SN. The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem.* 1981; 256(14): 7193–201.
69. Pittelkow M, Bremer E. Cellular adjustments of *Bacillus subtilis* and other *Bacilli* to fluctuating salinities. In: Ventosa A, Oren A, Ma Y, editors. *Halophiles and Hypersaline Environments*. Springer Berlin Heidelberg; 2011: p. 275–302.
70. Kunte H, Lentzen G, Galinski E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. *Curr Biotechnol.* 2014; 3(1): 10–25.
71. Galinski EA, Stein M, Amendt B, Kinder M. The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997; 117(3): 357–65.
72. Kolp S, Pietsch M, Galinski EA, Gütschow M. Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1764(7): 1234–42.
73. Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001; 130(3): 437–60.
74. Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, et al. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* 2010; 28(6): 782–801.
75. Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* 2005; 1(5):
76. Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Microbiology.* 1992; 138(8): 1629–38.
77. Galinski EA, Oren A. Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira marismortui*. *Eur J Biochem.* 1991; 198(3): 593–8.
78. Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Microbiology.* 1990; 136(4): 705–12.

- 
79. Bünger J, Degwert J, Driller H. The protective function of compatible solute ectoine on the skin, skin cells and its biomolecules with respect to UV radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Mag.* 2001; 4: 127–31.
  80. Buommino E, Schiraldi C, Baroni A, Paoletti I, Lamberti M, De Rosa M, et al. Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones.* 2005; 10(3): 197–203.
  81. Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett.* 2005; 579(21): 4775–80.
  82. Sydlik U, Gallitz I, Albrecht C, Abel J, Krutmann J, Unfried K. The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(1): 29–35.
  83. García-Esteva R, Argandoña M, Reina-Bueno M, Capote N, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ, et al. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol.* 2006; 188(11): 3774–84.
  84. Malin G, Lapidot A. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol.* 1996; 178(2): 385–95.
  85. Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, Hartmann H, Jebbar M, Pierik AJ, et al. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(23): 7286–96.
  86. Tanne C, Golovina EA, Hoekstra FA, Meffert A, Galinski EA. Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1-13.
  87. Mosier AC, Justice NB, Bowen BP, Baran R, Thomas BC, Northen TR, et al. Metabolites associated with adaptation of microorganisms to an acidophilic, metal-rich environment identified by stable-isotope-enabled metabolomics. *mBio.* 2013; 4(2): e00484-12.
  88. Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 57(3): 306–13.
  89. Lo C-C, Bonner CA, Xie G, D'Souza M, Jensen RA. Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2009; 73(4): 594–651.
  90. Stöveken N, Pittelkow M, Sinner T, Jensen RA, Heider J, Bremer E. A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *J Bacteriol.* 2011; 193(17): 4456–68.
  91. Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, et al. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol.* 1999; 181(1): 91–9.

92. Peters P, Galinski E a., Trüper H g. The biosynthesis of ectoine. FEMS Microbiol Lett. 1990: 71(1-2): 157-62.
93. Widderich N, Kobus S, Höppner A, Riclea R, Seubert A, Dickschat JS, et al. Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: A metal-containing member of the cupin superfamily. PLoS ONE. 2016: 11(3):
94. Bursy J, Pierik AJ, Pica N, Bremer E. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. J Biol Chem. 2007 : 282(43): 31147-55.
95. Höppner A, Widderich N, Lenders M, Bremer E, Smits SHJ. Crystal structure of the ectoine hydroxylase, a snapshot of the active site. J Biol Chem. 2014: 289(43): 29570-83.
96. Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature. 1999: 399(6736): 541-8.
97. Suttle CA. Marine viruses--major players in the global ecosystem. Nat Rev Microbiol. 2007: 5(10): 801-12.
98. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev. 2004: 28(2): 127-81.
99. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol Rev. 1992: 56(3): 430-81.
100. Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Kung C. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. Annu Rev Physiol. 1997: 59: 633-57.
101. Kieft TL, soroker E, firestone MK. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. Soil Biol Biochem. 1987: 19(2): 119-26.
102. Lambert C, Erdmann A, Eikmanns M, Kramer R. Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. Appl Environ Microbiol. 1995: 61(12): 4334-42.
103. Ruffert S, Lambert C, Peter H, Wendisch VF, Kramer R. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. Eur J Biochem. 1997: 247(2): 572-80.
104. Rice KC, Bayles KW. Molecular control of bacterial death and lysis. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2008: 72(1): 85-109.
105. Bohannan BJM, Lenski RE. Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. Ecol Lett. 2000: 3(4): 362-77.
106. Mann NH. The third age of phage. PLoS Biol. 2005: 3(5): 182.
107. Suttle CA. Viruses in the sea. Nature. 2005: 437(7057): 356-61.
108. McCue KF, Hanson AD. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. Plant Mol Biol. 1992: 18(1): 1-11.
109. Roesser M, Müller V. Osmoadaptation in *Bacteria* and *Archaea*: common principles and differences. Environ Microbiol. 2001: 3(12): 743-54.

110. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. 1982; 217(4566): 1214–22.
111. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*. 1993; 294 (1): 1–14.
112. Incharoensakdi A, Waditee R. Degradation of glycinebetaine by betaine-homocysteine methyltransferase in *Aphanothece halophytica*: effect of salt downshock and starvation. *Curr Microbiol*. 2000; 41(4): 227–31.
113. Galinski EA, Herzog RM. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol*. 1990; 153(6): 607–13.
114. Ollivier B, Caumette P, Garcia JL, Mah RA. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev*. 1994; 58(1): 27–38.
115. Boncompagni E, Osteras M, Poggi MC, le Rudulier D. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(5): 2072–7.
116. Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wróblewski H, Blanco C, et al. Osmoadaptation in *Rhizobia*: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol*. 1994; 176(17): 5210–7.
117. Serra AL, Mariscotti JF, Barra JL, Lucchesi GI, Domenech CE, Lisa AT. Glycine Betaine transmethylase mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2002; 184(15): 4301–3.
118. Goldmann A, Lecoeur L, Message B, Delarue M, Schoonejans E, Tepfer D. Symbiotic plasmid genes essential to the catabolism of proline betaine, or stachydrine, are also required for efficient nodulation by *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 115(2–3): 305–11.
119. Kumar R, Zhao S, Vetting MW, Wood BM, Sakai A, Cho K, et al. Prediction and Biochemical Demonstration of a Catabolic Pathway for the Osmoprotectant Proline Betaine. *mBio*. 2014; 5(1).
120. Dickschat JS, Zell C, Brock NL. Pathways and Substrate Specificity of DMSP catabolism in marine Bacteria of the *Roseobacter* clade. *ChemBioChem*. 2010; 11(3): 417–25.
121. Herzog RM, Galinski EA, Trüper HG. Degradation of the compatible solute trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*: isolation and characterization of trehalase. *Arch Microbiol*. 1990; 153(6): 600–6.
122. Welsh DT, Guyoneaud R, Caumette P. Utilization of the compatible solutes sucrose and trehalose by purple sulfur and nonsulfur bacteria. *Can J Microbiol*. 1998; 44(10): 974–9.
123. Manzanera M, García de Castro A, Tøndervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR, Tunnacliffe A. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9): 4328–33.
124. Jebbar M, Sohn-Bösser L, Bremer E, Bernard T, Blanco C. Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*. 2005; 187(4): 1293–304.

125. Hanekop N, Höing M, Sohn-Bösser L, Jebbar M, Schmitt L, Bremer E. Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine. *J Mol Biol.* 2007; 374(5): 1237–50.
126. Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR Family of Bacterial Regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA Subfamilies. *J Biol Chem.* 2002; 277(15): 12507–15.
127. Lecher J, Pittelkow M, Zobel S, Bursy J, Bönig T, Smits SHJ, et al. The crystal structure of UehA in complex with ectoine-A comparison with other TRAP-T binding proteins. *J Mol Biol.* 2009; 389(1): 58–73.
128. Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H, et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T. *Environ Microbiol.* 2011; 13(8): 1973–94.
129. Vreeland RH, Litchfield CD, Martin EL, Elliot E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant *Bacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1980; 30(2): 485–95.
130. Tkaczuk KL, A. Shumilin I, Chruszcz M, Evdokimova E, Savchenko A, Minor W. Structural and functional insight into the universal stress protein family. *Evol Appl.* 2013; 6(3): 434–49.
131. Brinkman AB, Ettema TJG, de Vos WM, van der Oost J. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol.* 2003; 48(2): 287–94.
132. Thaw P, Sedelnikova SE, Muranova T, Wiese S, Ayora S, Alonso JC, et al. Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(5): 1439–49.
133. Mulligan C, Fischer M, Thomas GH. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in *Bacteria* and *Archaea*. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35(1): 68–86.
134. Buchholz K, Seibel J. Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydr Res.* 2008; 343(12): 1966–79.
135. Inbar L, Frolov F, Lapidot A. The conformation of new tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. *Eur J Biochem FEBS.* 1993 ; 214(3): 897–906.
136. Yoshimura T, Esak N. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *J Biosci Bioeng.* 2003; 96(2): 103–9.
137. Fisch F, Fleites CM, Delenne M, Baudendistel N, Hauer B, Turkenburg JP, et al. A covalent succinylcysteine-like intermediate in the enzyme-catalyzed transformation of maleate to fumarate by maleate isomerase. *J Am Chem Soc.* 2010; 132(33): 11455–7.
138. Okrasa K, Levy C, Hauer B, Baudendistel N, Leys D, Micklefield J. Structure and mechanism of an unusual malonate decarboxylase and related racemases. *Chem Weinh Bergstr Ger.* 2008; 14(22): 6609–13.
139. Spies MA, Reese JG, Dodd D, Pankow KL, Blanke SR, Baudry J. Determinants of catalytic power and ligand binding in glutamate racemase. *J Am Chem Soc.* 2009; 131(14): 5274–84.

140. Gallagher DT, Monbouquette HG, Schröder I, Robinson H, Holden MJ, Smith NN. Structure of alanine dehydrogenase from *Archaeoglobus*: active site analysis and relation to bacterial cyclodeaminases and mammalian mu crystallin. J Mol Biol. 2004; 342(1): 119–30.
141. Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. EMBO Rep. 2003; 4(9): 850–4.
142. Möckel B, Eggeling L, Sahm H. Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 1992; 174(24): 8065–72.
143. Schröder I, Vadas A, Johnson E, Lim S, Monbouquette HG. A Novel archaeal alanine dehydrogenase homologous to ornithine cyclodeaminase and  $\mu$ -crystallin. J Bacteriol. 2004; 186(22): 7680–9.
144. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. Stryer Biochemie. 6. Elsevier Spektrum - Akademischer Verlag; 2007.
145. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. Biochem J. 1993; 290(1): 205–18.
146. Zheng Y, Roberts RJ, Kasif S, Guan C. Characterization of two new aminopeptidases in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2005; 187(11): 3671–7.
147. Louis P, Galinski EA. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. Microbiol Read Engl. 1997; 143 (4): 1141–9.
148. Makarova KS, Grishin NV. The Zn-peptidase superfamily: functional convergence after evolutionary divergence. J Mol Biol. 1999; 292(1): 11–7.
149. Rimsa V, Eadsforth TC, Joosten RP, Hunter WN. High-resolution structure of the M14-type cytosolic carboxypeptidase from *Burkholderia cenocepacia* refined exploiting PDB\_REDO strategies. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014; 70(2): 279–89.
150. Christen P, Mehta PK. From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Chem Rec N Y N. 2001; 1(6): 436–47.
151. Liu W, Peterson PE, Langston JA, Jin X, Zhou X, Fisher AJ, et al. Kinetic and crystallographic analysis of active site mutants of *Escherichia coli*  $\gamma$ -aminobutyrate aminotransferase. Biochemistry (Mosc). 2005; 44(8): 2982–92.
152. Yonaha K, Nishie M, Aibara S. The primary structure of omega-amino acid:pyruvate aminotransferase. J Biol Chem. 1992; 267(18): 12506–10.
153. Hidalgo E, Chen YM, Lin EC, Aguilar J. Molecular cloning and DNA sequencing of the *Escherichia coli* K-12 ald gene encoding aldehyde dehydrogenase. J Bacteriol. 1991; 173(19): 6118–23.
154. Niegemann E, Schulz A, Bartsch K. Molecular organization of the *Escherichia coli* gab cluster: nucleotide sequence of the structural genes *gabD* and *gabP* and expression of the GABA permease gene. Arch Microbiol. 1993; 160(6): 454–60.
155. Karmen A, Wróblewski F, LaDue JS. Transaminase activity in human blood. J Clin Invest. 1955; 34(1): 126–33.

156. Ladue JS, Wróblewski F. The significance of the serum glutamic oxalacetic transaminase activity following acute myocardial infarction. *Circulation*. 1955; 11(6): 871–7.
157. Commichau FM, Gunka K, Landmann JJ, Stülke J. Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *J Bacteriol*. 2008; 190(10): 3557–64.
158. Cánovas M, Torroglosa T, Iborra JL. Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into l-carnitine. *Enzyme Microb Technol*. 2005; 37(3): 300–8.
159. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(2): 112–24.
160. Wiggins PM. Role of water in some biological processes. *Microbiol Rev*. 1990; 54(4): 432–49.
161. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. Macmillan Learning. 2002
162. Goodman BE. Transport of small molecules across cell membranes: Water channels and urea transporters. *Adv Physiol Educ*. 2002; 26(3): 146–57.
163. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Diffusion of Small Molecules across Phospholipid Bilayers*. Macmillan Learning. 2000
164. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Carrier Proteins and Active Membrane Transport*. Garland Science. 2002
165. Padan E. *Bacterial Membrane Transport: Superfamilies of Transport Proteins*. In: eLS John Wiley & Sons, Ltd; 2001
166. Berger EA. Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(5): 1514–8.
167. Berger EA, Heppel LA. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1974; 249(24): 7747–55.
168. Quiñocho FA, Ledvina PS. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol*. 1996; 20(1): 17–25.
169. Tam R, Saier MH. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev*. 1993; 57(2): 320–46.
170. Wilkinson JB, Holland B, Kuchler K, Cole SP, Higgins C. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. In: *ABC Proteins*. London: Academic Press; 2003
171. Gonin S, Arnoux P, Pierru B, Lavergne J, Alonso B, Sabaty M, et al. Crystal structures of an extracytoplasmic solute receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. *BMC Struct Biol*. 2007; 7: 11.

172. Mulligan C, Geertsma ER, Severi E, Kelly DJ, Poolman B, Thomas GH. The substrate-binding protein imposes directionality on an electrochemical sodium gradient-driven TRAP transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(6): 1778–83.
173. Neiditch MB, Federle MJ, Pompeani AJ, Kelly RC, Swem DL, Jeffrey PD, et al. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell*. 2006; 126(6): 1095–108.
174. Berntsson RP-A, Smits SHJ, Schmitt L, Slotboom D-J, Poolman B. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett*. 2010; 584(12): 2606–17.
175. Fath MJ, Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*. 1993; 57(4): 995–1017.
176. Rice AJ, Park A, Pinkett HW. Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(5): 426–37.
177. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*. 1992; 8: 67–113.
178. Treptow NA, Shuman HA. Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Bacteriol*. 1985; 163(2): 654–60.
179. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2008; 72(2): 317–364.
180. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*. 2006; 580(4): 1023–35.
181. Forward JA, Behrendt MC, Wyborn NR, Cross R, Kelly DJ. TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1997; 179(17): 5482–93.
182. Rabus R, Jack DL, Kelly DJ, Saier MH. TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiol Read Engl*. 1999; 145 (12): 3431–45.
183. Poolman B, Glaasker E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol*. 1998; 29(2): 397–407.
184. Mulligan C, Kelly DJ, Thomas GH. Tripartite ATP-independent periplasmic transporters: application of a relational database for genome-wide analysis of transporter gene frequency and organization. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007; 12(4): 218–26.
185. Kelly DJ, Thomas GH. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*. 2001; 25(4): 405–24.
186. Driessen AJ, Rosen BP, Konings WN. Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(8): 397–401.
187. Denger K, Smits THM, Cook AM. Genome-enabled analysis of the utilization of taurine as sole source of carbon or of nitrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Read Engl*. 2006; 152(11): 3197–206.



188. Mauchline TH, Fowler JE, East AK, Sartor AL, Zaheer R, Hosie AHF, et al. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103(47): 17933–8.
189. Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *Bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T. *J Bacteriol*. 2002; 184(11): 3078–85.
190. Kuhlmann SI, Terwisscha van Scheltinga AC, Bienert R, Kunte H-J, Ziegler C. 1.55 Å structure of the ectoine binding protein TeaA of the osmoregulated TRAP-transporter TeaABC from *Halomonas elongata*. *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 47(36): 9475–85.
191. Schweikhard ES, Kuhlmann SI, Kunte H-J, Grammann K, Ziegler CM. Structure and function of the universal stress protein TeaD and its role in regulating the ectoine transporter TeaABC of *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Biochemistry (Mosc)*. 2010; 49(10): 2194–204.
192. Foster PL. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007; 42(5): 373–97.
193. Guerrero R, Berlanga M. Life's unity and flexibility: the ecological link. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2006; 9(3): 225–35.
194. Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol Rev*. 2010; 34(5): 628–45.
195. Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: A revolutionary paradigm. *Proc Jpn Acad Ser B*. 2012; 88(9): 485–508.
196. Browning DF, Busby SJW. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(1): 57–65.
197. Hochschild A, Dove SL. Protein–Protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell*. 1998; 92(5): 597–600.
198. Rojo F. Repression of transcription initiation in *Bacteria*. *J Bacteriol*. 1999; 181(10): 2987–91.
199. Sanchez A, Osborne ML, Friedman LJ, Kondev J, Gelles J. Mechanism of transcriptional repression at a bacterial promoter by analysis of single molecules. *EMBO J*. 2011; 30(19): 3940–6.
200. Lee DJ, Minchin SD, Busby SJW. Activating transcription in *Bacteria*. *Annu Rev Microbiol*. 2012; 66(1): 125–52.
201. Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1849(8): 1017–39.
202. Konstantinidis KT, Tiedje JM. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(9): 3160–5.
203. Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*. 2005; 13(2): 52–6.

204. Marks F, Klingmüller U, Müller-Decker K. Cellular signal processing: An introduction to the molecular mechanisms of signal transduction. Garland Science; 2008. 649 p.
205. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. DNA-binding motifs in gene regulatory proteins. In. Molecular Biology of the cell. Garland Science. 2002
206. Savageau MA. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974; 71(6): 2453–5.
207. Beckett D. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. J Mol Biol. 2001; 314(3): 335–52.
208. Matthews KS, Falcon CM, Swint-Kruse L. Relieving repression. Nat Struct Mol Biol. 200; 7(3): 184–7.
209. Bell CE, Lewis M. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. Nat Struct Biol. 2000; 7(3): 209–14.
210. Schumacher MA, Choi KY, Lu F, Zalkin H, Brennan RG. Mechanism of corepressor-mediated specific DNA binding by the purine repressor. Cell. 1995; 83(1): 147–55.
211. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29(2): 231–62.
212. Haydon DJ, Guest JR. A new family of bacterial regulatory proteins. FEMS Microbiol Lett. 1991; 79(3): 291–5.
213. Yoshida K, Fujita Y, Sarai A. Missense mutations in the *Bacillus subtilis* Gnt repressor that diminish operator binding ability. J Mol Biol. 1993; 231(2): 167–74.
214. Hoskisson PA, Rigali S. Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. Adv Appl Microbiol. 2009; 69: 1–22.
215. Hoskisson PA, Rigali S, Fowler K, Findlay KC, Buttner MJ. DevA, a GntR-Like transcriptional regulator required for development in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 2006; 188(14): 5014–23.
216. Lee MH, Scherer M, Rigali S, Golden JW. PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. J Bacteriol. 2003; 185(15): 4315–25.
217. Miyazaki T, Miyazaki J, Yamane H, Nishiyama M. alpha-Aminoadipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. Microbiol Read Engl. 2004; 150(7): 2327–34.
218. Sung MH, Tanizawa K, Tanaka H, Kuramitsu S, Kagamiyama H, Hirotsu K, et al. Thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. Gene cloning, sequence determination, and preliminary x-ray characterization. J Biol Chem. 1991; 266(4): 2567–72.
219. Bramucci E, Milano T, Pascarella S. Genomic distribution and heterogeneity of MocR-like transcriptional factors containing a domain belonging to the superfamily of the pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes of fold type I. Biochem Biophys Res Commun. 2011; 415(1): 88–93.

220. Ko TP, Wu SP, Yang WZ, Tsai H, Yuan HS. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the *Escherichia coli* tyrosine aminotransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1999; 55(8): 1474–7.
221. Choi SY, Churchich DR, Churchich JE. Binding of new plp analogs to the catalytic domain of GABA transaminase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 127(1): 346–53.
222. Milano T, Contestabile R, Lo Presti A, Ciccozzi M, Pascarella S. The aspartate aminotransferase-like domain of Firmicutes MocR transcriptional regulators. *Comput Biol Chem*. 2015; 58: 55–61.
223. Belitsky BR. Role of PdxR in the activation of vitamin B6 biosynthesis in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. 2014; 92(5): 1113–28.
224. Jochmann N, Götter S, Tauch A. Positive transcriptional control of the pyridoxal phosphate biosynthesis genes *pdxST* by the MocR-type regulator PdxR of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Microbiology*. 2011; 157(1): 77–88.
225. Tramonti A, Fiascarelli A, Milano T, di Salvo ML, Nogués I, Pascarella S, et al. Molecular mechanism of PdxR – a transcriptional activator involved in the regulation of vitamin B6 biosynthesis in the probiotic bacterium *Bacillus clausii*. *FEBS J*. 2015; 282(15): 2966–84.
226. Wiethaus J, Schubert B, Pfänder Y, Narberhaus F, Masepohl B. The GntR-like regulator TauR activates expression of taurine utilization genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. 2008; 190(2): 487–93.
227. Belitsky BR. *Bacillus subtilis* GabR, a protein with DNA-binding and aminotransferase domains, is a PLP-dependent transcriptional regulator. *J Mol Biol*. 2004; 340(4): 655–64.
228. Belitsky BR, Sonenshein AL. GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of gamma-aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2002; 45(2): 569–83.
229. Edayathumangalam R, Wu R, Garcia R, Wang Y, Wang W, Kreinbring CA, et al. Crystal structure of *Bacillus subtilis* GabR, an autorepressor and transcriptional activator of *gabT*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(44): 17820–5.
230. Okuda K, Kato S, Ito T, Shiraki S, Kawase Y, Goto M, et al. Role of the aminotransferase domain in *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator. *Mol Microbiol*. 2015; 95(2): 245–57.
231. Okuda K, Ito T, Goto M, Takenaka T, Hemmi H, Yoshimura T. Domain characterization of *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator. *J Biochem (Tokyo)*. 2015; 158(3): 225–34.
232. Cronin CN, Kirsch JF. Role of arginine-292 in the substrate specificity of aspartate aminotransferase as examined by site-directed mutagenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 1988; 27(12): 4572–9.
233. Matharu A, Hayashi H, Kagamiyama H, Maras B, John RA. Contributions of the substrate-binding arginine residues to maleate-induced closure of the active site of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Eur J Biochem FEBS*. 2001; 268(6): 1640–5.
234. Miyawaki M, Tanase S, Morino Y. A critical arginine residue in cytosolic aspartate aminotransferase from pig heart. *J Biochem*. 1982; 91(3): 989–99.

- 
235. Durante-Rodríguez G, Mancheño JM, Rivas G, Alfonso C, García JL, Díaz E, et al. Identification of a missing link in the evolution of an enzyme into a transcriptional regulator. *PloS One*. 2013; 8(3): e57518.
236. Hawkins AR, Lamb HK, Radford A, Moore JD. Evolution of transcription-regulating proteins by enzyme recruitment: molecular models for nitrogen metabolite repression and ethanol utilisation in eukaryotes. *Gene*. 1994; 146(2): 145–58.
237. Pérez-Rueda E, Collado-Vides J. Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J Mol Evol*. 2001; 53(3): 172–9.
238. Brinkman AB, Dahlke I, Tuininga JE, Lammers T, Dumay V, de Heus E, et al. An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem*. 2000; 275(49): 38160–9.
239. Chen S, Rosner MH, Calvo JM. Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 2001; 312(4): 625–35.
240. Jafri S, Evoy S, Cho K, Craighead HG, Winans SC. An Lrp-type transcriptional regulator from *Agrobacterium tumefaciens* condenses more than 100 nucleotides of DNA into globular nucleoprotein complexes. *J Mol Biol*. 1999; 288(5): 811–24.
241. Kumarevel T, Nakano N, Ponnuraj K, Gopinath SCB, Sakamoto K, Shinkai A, et al. Crystal structure of glutamine receptor protein from *Sulfolobus tokodaii* strain 7 in complex with its effector l-glutamine: implications of effector binding in molecular association and DNA binding. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(14): 4808–20.
242. Madhusudhan KT, Huang N, Sokatch JR. Characterization of BkdR-DNA binding in the expression of the *bkd* operon of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*. 1995; 177(3): 636–41.
243. Willins DA, Ryan CW, Platko JV, Calvo JM. Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J Biol Chem*. 1991; 266(17): 10768–74.
244. Hart BR, Mishra PK, Lintner RE, Hinerman JM, Herr AB, Blumenthal RM. Recognition of DNA by the helix-turn-helix global regulatory protein Lrp is modulated by the amino terminus. *J Bacteriol*. 2011; 193(15): 3794–803.
245. de los Rios S, Perona JJ. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J Mol Biol*. 2007; 366(5): 1589–602.
246. Dey A, Shree S, Pandey SK, Tripathi RP, Ramachandran R. Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv AldR (rv2779c), a regulator of the ald gene: DNA-binding, and identification of small-molecule inhibitors. *J Biol Chem*. 2016;
247. Hart BR, Blumenthal RM. Unexpected coregulator range for the global regulator Lrp of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol*. 2011; 193(5): 1054–64.
248. Deng W, Wang H, Xie J. Regulatory and pathogenesis roles of *Mycobacterium* Lrp/AsnC family transcriptional factors. *J Cell Biochem*. 2011; 112(10): 2655–62.
249. Calvo JM, Matthews RG. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1994; 58(3): 466–90.

250. Newman E, Lin R. Leucine responsive regulatory protein - a global regulator of gene-expression in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol. 1995; 49: 747–75.
251. Suzuki M. Structure and function of the feast/famine regulatory proteins, FFRPs. Proc Jpn Acad Ser B-Phys Biol Sci. 2003; 79(9): 274–89.
252. Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, et al. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(26): 14674–9.
253. Magasanik B. Regulation of nitrogen utilization. Cold Spring Harb Monogr Arch. 1992; 21B(0): 283–317.
254. Poggio S, Domeinzain C, Osorio A, Camarena L. The nitrogen assimilation control (Nac) protein represses *asnC* and *asnA* transcription in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2002; 206(2): 151–6.
255. Blauwkamp TA, Ninfa AJ. Nac-mediated repression of the *serA* promoter of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2002; 45(2): 351–63.
256. Goss TJ, Perez-Matos A, Bender RA. Roles of glutamate synthase, *gltBD*, and *gltF* in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol. 2001; 183(22): 6607–19.
257. Gao R, Mack TR, Stock AM. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. Trends Biochem Sci. 2007; 32(5): 225–34.
258. Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr Opin Microbiol. 2000; 3(2): 165–70.
259. Mascher T, Helmann JD, Uuden G. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. Microbiol Mol Biol Rev. 2006; 70(4): 910–38.
260. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 2000; 69: 183–215.
261. Magasanik B. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. J Cell Biochem. 1993; 51(1): 34–40.
262. Merrick MJ, Edwards RA. Nitrogen control in bacteria. Microbiol Rev. 1995; 59(4): 604–22.
263. Ninfa AJ, Jiang P, Atkinson MR, Peliska JA. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. Curr Top Cell Regul. 2000; 36: 31–75.
264. Reitzer L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol. 2003; 57: 155–76.
265. Foster-Hartnett D, Cullen PJ, Gabbert KK, Kranz RG. Sequence, genetic, and *lacZ* fusion analyses of a *nifR3-ntrB-ntrC* operon in *Rhodobacter capsulatus*. Mol Microbiol. 1993; 8(5): 903–14.

- 
266. Carrica M del C, Fernandez I, Martí MA, Paris G, Goldbaum FA. The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol Microbiol.* 2012; 85(1): 39–50.
267. Ishida ML, Assumpção MC, Machado HB, Benelli EM, Souza EM, Pedrosa FO. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2002; 35(6): 651–61.
268. Krikos A, Mutoh N, Boyd A, Simon MI. Sensory transducers of *E. coli* are composed of discrete structural and functional domains. *Cell.* 1983; 33(2): 615–22.
269. Russo AF, Koshland DE. Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing. *Science.* 1983; 220(4601): 1016–20.
270. Keener J, Kustu S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(14): 4976–80.
271. Jeong J-A, Baek E-Y, Kim SW, Choi J-S, Oh J-I. Regulation of the ald gene encoding alanine dehydrogenase by AldR in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 2013; 195(16): 3610–20.
272. Böhning T. Transposon-Mutagenese in *Silicibacter pomeroyi* DSS-3 und biochemische Analyse des periplas- matischen Bindeproteins TehA. [Marburg]: Philipps-Universität Marburg; 2008.
273. Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory.; 1972.
274. Vargas C, Jebbar M, Carrasco R, Blanco C, Calderón MI, Iglesias-Guerra F, et al. Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol.* 2006; 100(1): 98–107.
275. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006; 22(2): 195–201.
276. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc.* 2008; 4(1): 1–13.
277. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3381–5.
278. Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal Phosphate Enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73(1): 383–415.
279. Ford GC, Eichele G, Jansonius JN. Three-dimensional structure of a pyridoxal-phosphate-dependent enzyme, mitochondrial aspartate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci.* 1980; 77(5): 2559–63.
280. congress. Chemical and biological aspects of vitamin B6 catalysis. Part B: Metabolism, structure, and function of transaminases. Proceedings of a symposium held in Athens, Greece, May 29-June 3, 1983. *Prog Clin Biol Res.* 1984;144B:1–349.

281. Hughes RC, Jenkins WT, Fischer EH. The site of binding of pyridoxal-5'-phosphate to heart glutamic-aspartic transaminase. PNAS. 1962: 48.
282. Olmo MT, Sánchez-Jiménez F, Medina MA, Hayashi H. Spectroscopic analysis of recombinant rat histidine decarboxylase. J Biochem (Tokyo). 2002: 132(3): 433–9.
283. Greenfield NJ, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochemistry (Mosc). 1969: 8(10): 4108–16.
284. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Humana Press; 2005. (The Proteomics Protocols Handbook).
285. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional Regulation of Metabolism. Physiol Rev. 2006: 86(2): 465–514.
286. Day TP, Sil D, Shukla NM, Anbanandam A, Day VW, David SA. Imbuing Aqueous Solubility to Amphotericin B and Nystatin with a Vitamin. Mol Pharm. 2011: 8(1): 297–301.
287. Salvo D, L M, Budisa N, Contestabile R. PLP-dependent Enzymes: a Powerful Tool for Metabolic Synthesis of Non-canonical Amino Acids. In Martin G. Hicks and Carsten Kettner; 2013. p. 54–131.
288. Baaske P, Wienken CJ, Reineck P, Duhr S, Braun D. Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. Angew Chem Int Ed. 2010: 49(12): 2238–41.
289. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. Assay Drug Dev Technol. 2011: 9(4): 342–53.
290. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. Nat Commun. 2010: 1: 100.
291. Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L, Elofsson A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. Nucleic Acids Res. 2015: 43(W1): W401-407.
292. Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, et al. The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. Nucleic Acids Res. 2011: gkr947.
293. Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. Nucleic Acids Res. 2014: (Database issue):D26-31.
294. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. Nucleic Acids Res. 2011: 39(Web Server issue):W475-478.
295. Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biol. 2002: 3(2):reviews0003.1-reviews0003.8.
296. Magot M, Basso O, Tardy-Jacquenod C, Caumette P. *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. Int J Syst Evol Microbiol. 2004: 54(5): 1693–7.

297. Shaw JG, Hamblin MJ, Kelly DJ. Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C4-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*. 1991; 5(12): 3055–62.
298. Xu Y, Labedan B, Glansdorff N. Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2007; 71(1): 36–47.
299. Reuter K, Pittelkow M, Bursy J, Heine A, Craan T, Bremer E. Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PloS One*. 2010; 5(5): e10647.
300. Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*. 2005; 208(15): 2819–30.
301. Bradley TJ. *Animal Osmoregulation*. OUP Oxford; 2009. 179 p.
302. Deacon JW. *Fungal Biology*. John Wiley & Sons; 2013. 679 p.
303. Rao KVM, Raghavendra AS, Reddy KJ. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer Science & Business Media; 2006. 372 p.
304. Wood JM. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 215–38.
305. Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T, Blanco C. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol*. 1992; 174(15): 5027–35.
306. Bourdin B, Adenier H, Perrin Y. Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale*. 2007; 45(12): 926–31.
307. Rivoal J, Hanson AD. Choline-O-Sulfate Biosynthesis in Plants (Identification and Partial Characterization of a Salinity-Inducible Choline Sulfotransferase from Species of *Limonium* (Plumbaginaceae). *Plant Physiol*. 1994; 106(3): 1187–93.
308. Devor KA, Mudd JB. Structural analysis of phosphatidylcholine of plant tissue. *J Lipid Res*. 1971; 12(4): 396–402.
309. Moran MA, Belas R, Schell MA, González JM, Sun F, Sun S, et al. Ecological Genomics of Marine *Roseobacters*. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(14): 4559–69.
310. Polz MF, Hunt DE, Preheim SP, Weinreich DM. Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361(1475): 2009–21.
311. Sorokin DY. Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds by Obligately Organotrophic Bacteria. *Microbiology*. 2003; 72(6): 641–53.
312. Khmelenina V, Kalyuzhnaya M, Sakharovsky V, Suzina N, Trotsenko Y, Gottschalk G. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch Microbiol*. 1999; 172(5): 321–9.
313. Holland HL, Riemland E. The mechanism of enzymic hydroxyl group removal from C-21 of tetrahydrodeoxycorticosterone. *Can J Chem*. 1985; 63(4): 981–3.



- 
314. Mackie A, Keseler IM, Nolan L, Karp PD, Paulsen IT. Dead end metabolites - defining the known unknowns of the *E. coli* metabolic network. PLOS ONE. 2013; 8(9): e75210.
315. Bazan JF, Weaver LH, Roderick SL, Huber R, Matthews BW. Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(7): 2473–7.
316. Hoeffken HW, Knof SH, Bartlett PA, Huber R, Moellering H, Schumacher G. Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*. J Mol Biol. 1988; 204(2): 417–33.
317. Rao DR, Hariharan K, Vijayalakshmi KR. A study of the metabolism of L-alpha gamma-diaminobutyric acid in a *Xanthomonas* species. Biochem J. 1969; 114(1): 107–15.
318. Kaneoke M, Shimizu E, Yorifuji T. Metabolism of L-Arginine, Agmatine, and Related Compounds in *Nocardioides simplex*. Biosci Biotechnol Biochem. 1994; 58(2): 244–9.
319. Pizer LI. Glycine Synthesis and Metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1965; 89(4): 1145–50.
320. Black S, Wright NG. Homoserine Dehydrogenase. J Biol Chem. 1955; 213(1): 51–60.
321. Castro P, Huber ME. Marine Biology. McGraw-Hill; 2007. 490 p.
322. Strom AR, Kaasen I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol Microbiol. 1993; 8(2): 205–10.
323. Warren CR. Response of osmolytes in soil to drying and rewetting. Soil Biol Biochem. 2014; 70: 22–32.
324. Huynen MA, Bork P. Measuring genome evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(11): 5849–56.
325. Tamames J. Evolution of gene order conservation in prokaryotes. Genome Biol. 2001; 2(6): research0020.1-research0020.11.
326. Dandekar T, Snel B, Huynen M, Bork P. Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. Trends Biochem Sci. 1998; 23(9): 324–8.
327. Lawrence JG, Roth JR. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. Genetics. 1996; 143(4): 1843–60.
328. Kondrashov FA. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 2012; 1108:
329. Innan H, Kondrashov F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. Nat Rev Genet. 2010; 11(2): 97–108.
330. Brown CJ, Todd KM, Rosenzweig RF. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. Mol Biol Evol. 1998; 15(8): 931–42.
331. Riehle MM, Bennett AF, Long AD. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. 2001; 98(2): 525–30.

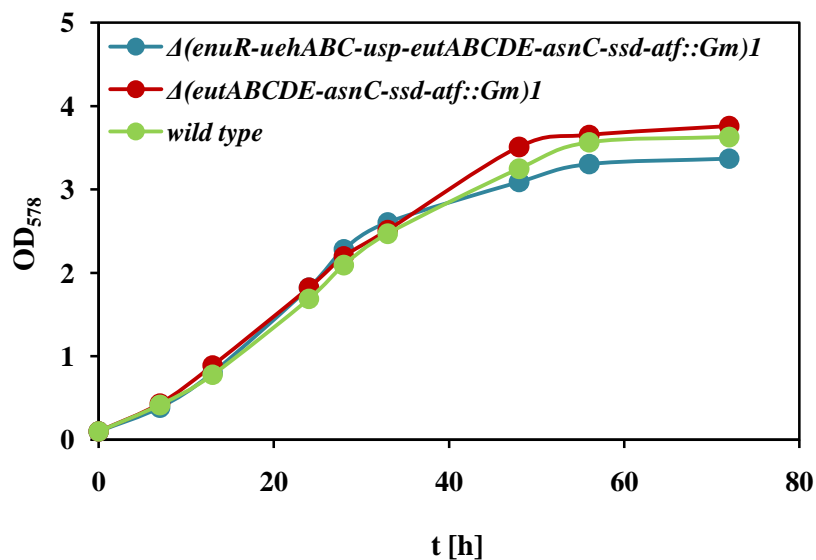
- 
332. Conant GC, Wolfe KH. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(12): 938–50.
333. Zhang J. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol.* 2003; 18(6): 292–8.
334. Tanaka M. Where Do All Those Genes Come From? *PLOS Biol.* 2005; 3(5): e169.
335. Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB. Revisited gene regulation in bacteriophage  $\lambda$ . *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(2): 145–52.
336. Bundy BM, Collier LS, Hoover TR, Neidle EL. Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(11): 7693–8.
337. Craven SH, Ezezika OC, Haddad S, Hall RA, Momany C, Neidle EL. Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Microbiol.* 2009; 72(4): 881–94.
338. Schleif R. AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34(5): 779–96.
339. Ichikawa H, Halberg R, Kroos L. Negative regulation by the *Bacillus subtilis* GerE protein. *J Biol Chem.* 1999; 274(12): 8322–7.
340. Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15): 7207–18.
341. Hidalgo E, Leautaud V, Demple B. The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. *EMBO J.* 1998; 17(9): 2629–36.
342. Philips SJ, Canalizo-Hernandez M, Yildirim I, Schatz GC, Mondragón A, O'Halloran TV. Allosteric transcriptional regulation via changes in the overall topology of the core promoter. *Science.* 2015; 349(6250): 877–81.
343. Takenaka T, Ito T, Miyahara I, Hemmi H, Yoshimura T. A new member of MocR/GabR-type PLP-binding regulator of D-alanyl-D-alanine ligase in *Brevibacillus brevis*. *FEBS J.* 2015 Nov;282(21):4201–17.
344. Taw MN, Lee H-I, Lee S-H, Chang W-S. Characterization of MocR, a GntR-like transcriptional regulator, in *Bradyrhizobium japonicum*: its impact on motility, biofilm formation, and soybean nodulation. *J Microbiol Seoul Korea.* 2015; 53(8): 518–25.
345. Suvorova IA, Rodionov DA. Comparative genomics of pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcription factor regulons in Bacteria. *Microb Genomics.* 2016; 2(1).
346. Al-Zyoud WA, Hynson RM, Ganuelas LA, Coster AC, Duff AP, Baker MA, et al. Binding of transcription factor GabR to DNA requires recognition of DNA shape at a location distinct from its cognate binding site. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(3): 1411–20.
347. Chechik G, Oh E, Rando O, Weissman J, Regev A, Koller D. Activity motifs reveal principles of timing in transcriptional control of the yeast metabolic network. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(11): 1251–9.

348. Beijer L, Rutberg L. Utilisation of glycerol and glycerol 3-phosphate is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett. 1992; 100(1-3): 217-20.
349. Chubukov V, Zuleta IA, Li H. Regulatory architecture determines optimal regulation of gene expression in metabolic pathways. Proc Natl Acad Sci. 2012; 109(13): 5127-32.
350. Raghavan V, Lowe EC, Townsend GE, Bolam DN, Groisman EA. Tuning transcription of nutrient utilization genes to catabolic rate promotes growth in a gut bacterium. Mol Microbiol. 2014; 93(5): 1010-25.
351. Kochanowski K, Sauer U, Chubukov V. Somewhat in control--the role of transcription in regulating microbial metabolic fluxes. Curr Opin Biotechnol. 2013; 24(6): 987-93.
352. Friedman EB, Olson JS, Matthews KS. Interaction of lac repressor with inducer. Kinetic and equilibrium measurements. J Mol Biol. 1977; 111(1): 27-39.
353. Bender RA. Regulation of the Histidine Utilization (Hut) System in Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2012; 76(3): 565-84.
354. Schindler U, Sans N, Schröder J. Ornithine cyclodeaminase from octopine Ti plasmid Ach5: identification, DNA sequence, enzyme properties, and comparison with gene and enzyme from nopaline Ti plasmid C58. J Bacteriol. 1989; 171(2): 847-54.
355. Lee SY, Cho J-Y, Lee HJ, Kim Y-H, Min J. Enhancement of ornithine production in proline-supplemented *Corynebacterium glutamicum* by ornithine cyclodeaminase. J Microbiol Biotechnol. 2010; 20(1): 127-31.
356. Jäger J, Moser M, Sauder U, Jansonius JN. Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. J Mol Biol. 1994; 239(2): 285-305.
357. Dahlke I, Thomm M. A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. Nucleic Acids Res. 2002; 30(3): 701-10.
358. Ouhammouch M, Langham GE, Hausner W, Simpson AJ, El-Sayed NMA, Geiduschek EP. Promoter architecture and response to a positive regulator of archaeal transcription. Mol Microbiol. 2005; 56(3): 625-37.
359. Koike H, Ishijima SA, Clowney L, Suzuki M. The archaeal feast/famine regulatory protein: potential roles of its assembly forms for regulating transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(9): 2840-5.
360. Ninfa AJ, Ninfa EG, Lupas AN, Stock A, Magasanik B, Stock J. Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(15): 5492-6.
361. Busby SJW, Thomas CM, Brown NL. Molecular Microbiology. Springer Science & Business Media; 2013. 330 p.
362. Schwacha A, Bender RA. The nac (nitrogen assimilation control) gene from *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol. 1993; 175(7): 2107-15.

363. Bender RA, Snyder PM, Bueno R, Quinto M, Magasanik B. Nitrogen regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the *nac* gene. J Bacteriol. 1983; 156(1): 444–6.
364. Muse WB, Bender RA. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1998; 180(5): 1166–73.
365. Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. Nucleic Acids Res. 2012; 40(Database issue): D26–32.
366. Miller JH. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1992.
367. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 1990; 185: 60–89.
368. Todd JD, Curson ARJ, Sullivan MJ, Kirkwood M, Johnston AWB. The *Ruegeria pomeroyi acul* Gene Has a Role in DMSP Catabolism and Resembles *yhdH* of *E. coli* and Other Bacteria in Conferring Resistance to Acrylate. PLOS ONE. 2012; 7(4): e35947.
369. Baumann P, Baumann L, Mandel M, Allen RD. Taxonomy of marine bacteria: *Beneckea nigrapulchrituda* sp. n. J Bacteriol. 1971; 108(3): 1380–3.
370. Elbing K, Brent R. Media Preparation and Bacteriological Tools. In: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.; 2001
371. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
372. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
373. Milner HW, Lawrence NS, French CS. Colloidal dispersion of chloroplast material. Science. 1950; 111(2893): 633–4.
374. Gray D. Handbook of Amer. 2n edition. New York: McGraw- Hill; 1963.
375. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239(4839): 487–91.
376. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. New York: Academic Press, Inc.; 1989. (PCR Proto- cols: A Guide to Methods and Applications).
377. Dennis JJ, Zylstra GJ. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(7): 2710–5.
378. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods. 2009; 6(5): 343–5.
379. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J Mol Biol. 1961; 3(2): 208–IN1.

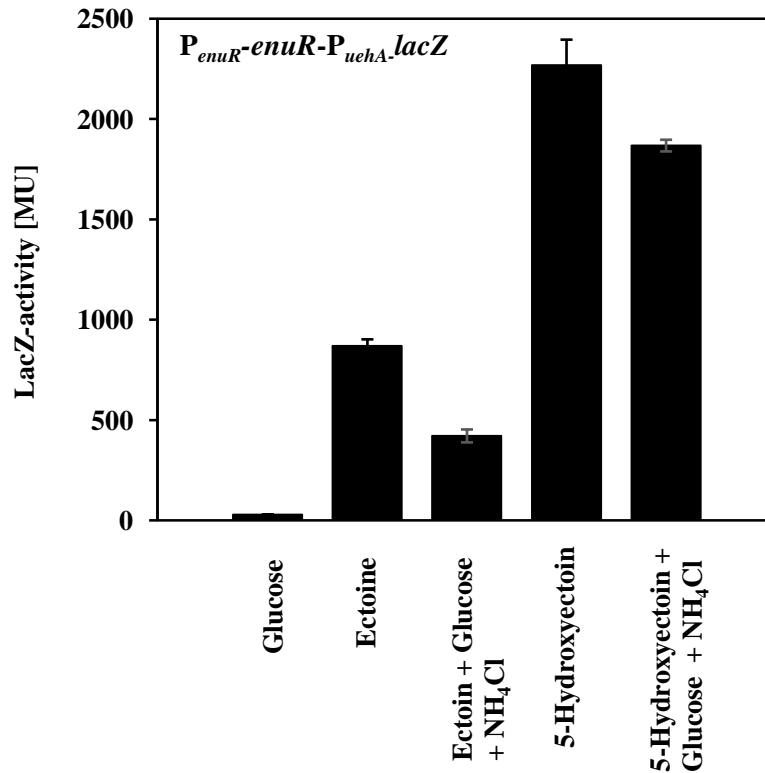
380. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970: 227(5259): 680–5.
381. Völker U, Engelmann S, Maul B, Riethdorf S, Völker A, Schmid R, et al. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Read Engl*. 1994: 140(4): 741–52.
382. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma Oxf Engl*. 2007: 23(21): 947–8.
383. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990: 215(3): 403–10.
384. Kvitko BH, Collmer A. Construction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant and polymutant strains. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011: 712: 109–28.
385. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979: 76(4): 1648–52.
386. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013: 41(Database issue): D36–42.
387. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW. Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1984.
388. Todd JD, Curson ARJ, Kirkwood M, Sullivan MJ, Green RT, Johnston AWB. DddQ, a novel, cupin-containing, dimethylsulfoniopropionate lyase in marine *Roseobacters* and in uncultured marine bacteria. *Environ Microbiol*. 2011: 13(2): 427–38.
389. Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2003: In National Center for Biotechnology Information (US); Bethesda (MD): 2013.
390. Tomita T, Miyagawa T, Miyazaki T, Fushinobu S, Kuzuyama T, Nishiyama M. Mechanism for multiple-substrates recognition of  $\alpha$ -amino adipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2009: 75(2): 348–59.
391. Fernández I, Otero LH, Klinke S, Carrica M del C, Goldbaum FA. Snapshots of Conformational Changes Shed Light into the NtrX Receiver Domain Signal Transduction Mechanism. *J Mol Biol*. 2015: 427(20): 3258–72.

## 8. Anhang



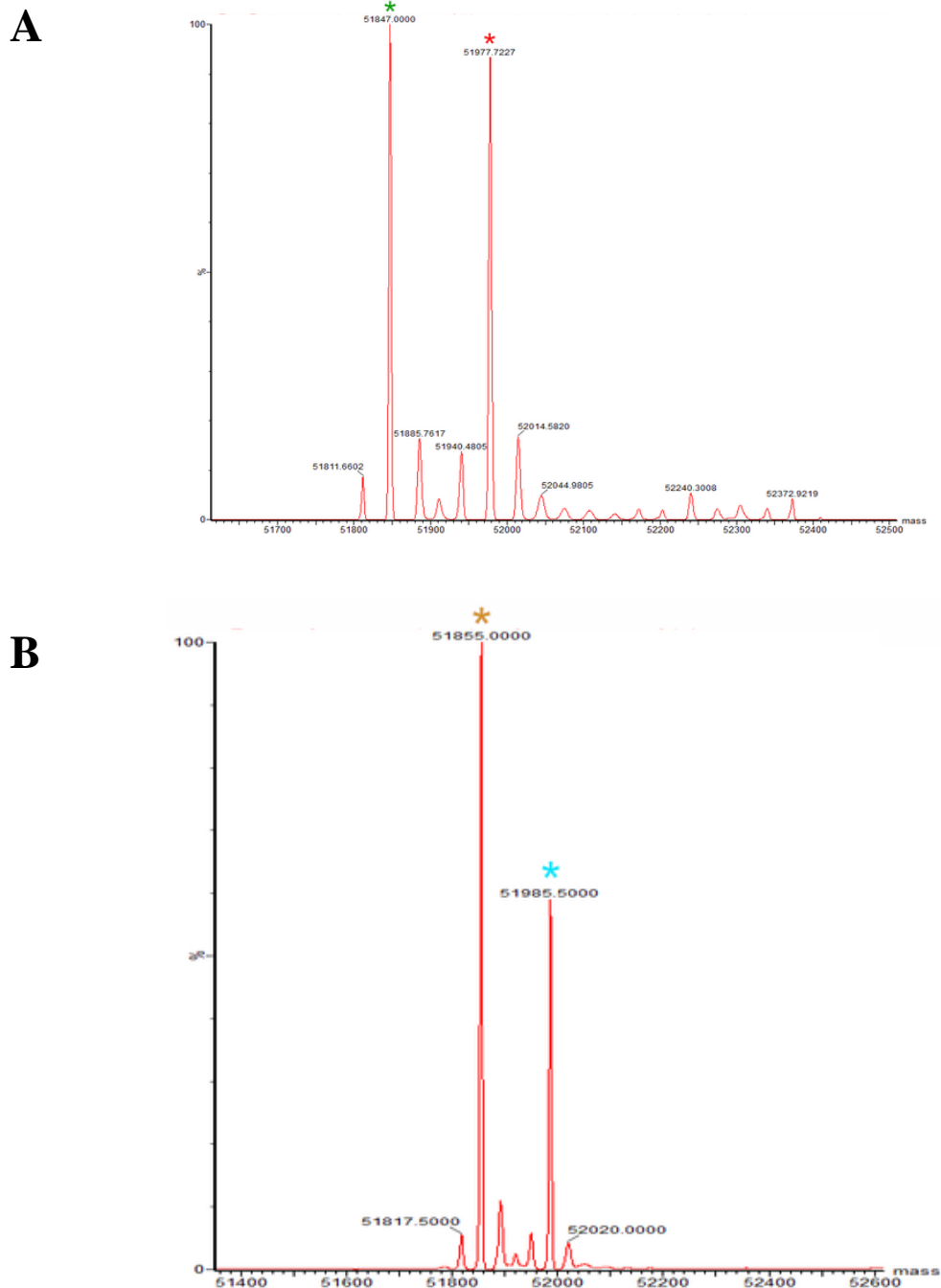
**Abbildung A1: Wachstum von *R. pomeroyi*-Kulturen auf Glucose**

Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von *R. pomeroyi* J470, *R. pomeroyi* ASR6 [ $\Delta(enuR-uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] und *R. pomeroyi* ASR12 [ $\Delta(eutABCDE-asnC-ssd-atf::Gm)1$ ] in Basalmedium mit Glucose (28 mM) als Kohlenstoffquelle und  $NH_4Cl$  (0,2 mM) als Stickstoffquelle.



**Abbildung A2: Katabolitrepression des katabolen 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Stoffwechselweges in *R. pomeroyi* J470**

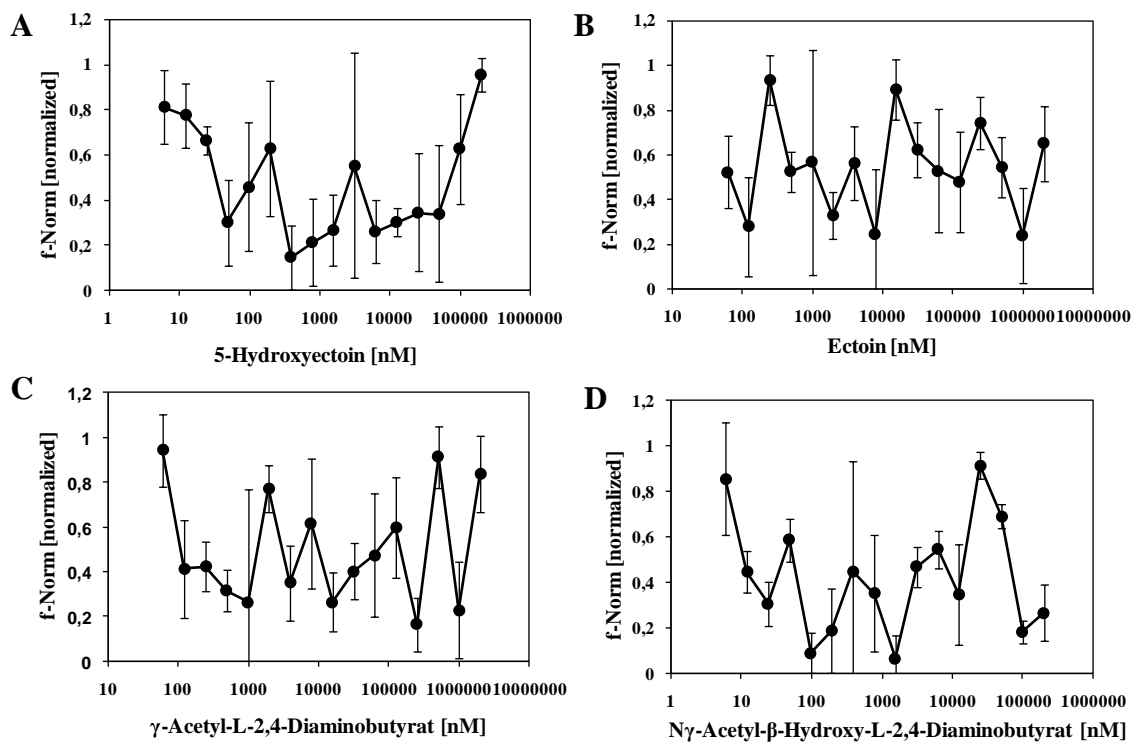
Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion in *R. pomeroyi* J470. Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/NH<sub>4</sub>Cl, Ectoin, Glucose/NH<sub>4</sub>Cl und Ectoin, 5-Hydroxyectoin oder Glucose/NH<sub>4</sub>Cl mit 5-Hydroxyectoin bei 30°C kultiviert. Glucose, Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden in einer Konzentration von 28 mM hinzugegeben. Die Expression ausgehend von *PuehA* sinkt auf etwa 60%, wenn Ectoin im Medium vorliegt und auf etwa 75%, wenn 5-Hydroxyectoin im Medium vorhanden ist. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.



**Abbildung A3: Massenspektren von EnuR und EnuR\***

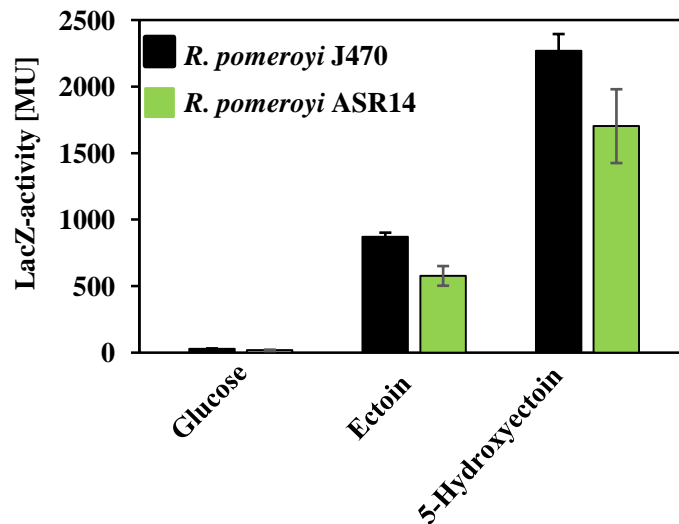
Die rekombinanten Proteine EnuR-*Strep*-tag II (A) und EnuR\*-*Strep*-tag II (B) wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und über einen HPLC-Lauf entsalzt. Die MS-Analyse erfolgte mit einem Synapt G2Si mass spectrometer. Detektiert wurden positive Ionen innerhalb eines Massenbereichs von 500-5000 m/z. (A) Der Massenpeak des ganzen EnuR-Peptids ist mit einem roten Stern gekennzeichnet, der Massenpeak für EnuR ohne Startmethionin mit einem grünen Stern. (B) Der Massenpeak des ganzen EnuR\*-Peptids ist mit einem hellblauen Stern gekennzeichnet, der Massenpeak für EnuR ohne Startmethionin mit einem orangefarbenen Stern.





**Abbildung A4: Untersuchungen des Verhaltens von EnuR in der Thermophorese nach Zusatz verschiedener Liganden**

Fluoreszenz-markiertes EnuR (200 nM) wurden mit einer seriellen Verdünnung (1:2) von (A) 5-Hydroxyectoin, (B) Ectoin, (C) N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat und (D) N $\gamma$ -Acetyl- $\beta$ -Hydroxy-L-2,4-Diaminobutyrat (Konzentrationen zwischen 1 mM und 3,6 nM) im Thermophoresepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween) titriert. Die MST Bindereaktionen wurden mit dem Monolith NT.015 bei 21°C gemessen. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.



**Abbildung A5: Expressionsmuster der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Reporterfusion in *R. pomeroyi* ASR14 [ $\Delta(ssd-atf::Gm)1$ ]**

Gezeigt ist die Promotoraktivität der  $P_{enuR}$ - $enuR^+$ - $P_{uehA}$ - $lacZ$ -Fusion im *R. pomeroyi* J470 Wildtyp (schwarz) und in *R. pomeroyi* ASR14 (grün). Die entsprechenden Kulturen wurden in Basalmedium mit Glucose/ $NH_4Cl$ , Ectoin oder 5-Hydroxyectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei 30°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils drei technischen Parallelen berechnet.

<i>Ochrobactrum_sp_EGD-AQ16</i>	1	.....MRMKHL.T.....I.SALF.SAVAVLS.FTLPSQAVTIDDLKGAQFVRGATANEVRYGYMDESAAKQIGPDVAAAIKKLQIEEIDWTVTFPSLIPOLKAKRFEFVAAEQNVLPDRCKQVQTVANSSYGEGLL
<i>Ochrobactrum_sp_J50</i>	1	.....MRMKRH.I.....I.SALF.SAAAVFS.LSLPSQAVTVDDLKGAQFVRGATANEVRYGYMDESAAKQIGPDVAAAIKKLQIEEIDWTVTFPSLIPOLKAKRFEFVAAEQNVLPDRCKQVQTVANSSYGEGLL
<i>Verminephrobacter_sp_AH4</i>	1	.....MFHSRVLG.....L.SALF.ALATALP.VLPAAHATTPEIKDRGYVRAATANEVRYGYMDDSSAGIGPDVAMAVLKTMDIEVAWSVTFFOTLIPOLKARRFDFAAEQNI SPERCKQVAFTEPNSSYGEGLL
<i>Agrobacterium_turefaciens_str_C58</i>	1	.....MNMTKLAG.....L.SALF.ALIIG....VTSASALTLEEVKKQGYIRAAATANEVRYGYMDDSSAGIGPDVANAVLKSMDIEEWNVTVPFOTLIPOLKARRFDFAAEQNI SPERCKQVAFTEPNSSYGEGLL
<i>Paracoccus_sp_TRP</i>	1	.....MMKKC.LIALVLVAAPLALADKDLKQGYVRIAGNEPPYTAVASDQKVSQAAPDVARAVFERLQIKDLEASIAEYQAMIPSLQAGRVDAITAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEALL
<i>Paracoccus_sp_J4</i>	1	.....MMKKC.LIALVLVAAPLALADKDLKQGYVRIAGNEPPYTAVASDQKVSQAAPDVARAVFERLQIKDLEASIAEYQAMIPSLQAGRVDAITAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEALL
<i>Mesorhizobium_loti_MAFF303099</i>	1	1MPEATTSSRDGKPPRTNQDKKQELGTMKKLGLA.....QVAGLA.LAAVLAASIPGASDDSKLEQLKQGFARVAIANEPPYTAVAADQKVSQAAPDVARVIFKRLQVGDIVASISEYQAMIPOLKAGRFDDVTAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEAML
<i>Rhizobium_etli_GAT_652</i>	1	.....MKAGYV.....LSAVSL.SVLLVTAAAPASAADKLEQLKQGFARVAIANEPPYTAVAADQKVSQAAPDVARVIFKRLQVGDIVASISEYQAMIPOLKAGRFDDVTAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEAF
<i>Rhizobium_etli_CFN_42_</i>	1	.....MKAGYV.....LSAVSL.SVLLVTAAAPASAADKLEQLKQGFARVAIANEPPYTAVAADQKVSQAAPDVARVIFKRLQVGDIVASISEYQAMIPOLKAGRFDDVTAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEAF
<i>Ensifer_sp_ZNC0028</i>	1	.....MSMRFTLT.....ITASTG.ALTALMAAPAW.ADGKLEELKQGFARVAIANEPPYTAVAADQKVSQAAPDVARVIFKRLQVGDIVASISEYQAMIPOLKAGRFDDVTAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEAF
<i>Sinorhizobium_meliloti_1021</i>	1	.....MKLRDFMA.....MAAGAT.ALMVAATPAADENKLEELKQGFARVAIANEPPYTAVAADQKVSQAAPDVARVIFKRLQVGDIVASISEYQAMIPOLKAGRFDDVTAGLFMKPERCQAVAYSEFILCDAEAF
<i>Asinobacter_sp_J41</i>	1	.....MKGTLL.....RHIALGMAALAVGSAAGSAIAQSLLEAESQPIRIGFANEIFFAYPDGDSKPKGFVNMVITIAVLKHMSEKIEPVQTEWGLIPOLNWRFBIVTGOMILASQENIAFSEPIATVGQFI
<i>Klebsiella_pneumoniae_UCI_20</i>	1	.....MKKWLKKTQT.....ALGIG.ALALF.INFSCHADTALDKLNTGIEISIGYNEEPPAYADASKVTDESPEIRIIFKKLQAKKQVSVLTWGLIPOLNWRFBIVTGOMILASQENIAFSEPIATVGQFI
<i>Burkholderia_sp_WSM3556</i>	1	.....MK.....AKRTSGLLQALCVAAALAMPADHASAETTLDRIQRTQEVRIQYANAPFAYTTPDKVTDESPEIRARKIFQRMQVKKVQDVLTEWGLIPOLNWRFBIVTGOMILASQENIAFSEPIATVGQFI
<i>Pseudomonas_aeruginosa_PA7</i>	1	.....MSTAPRSLRLALAGSLAQ.....LAASFASQAESTLERIQNSATVRIQYANAPFAYTTPDKVTDESPEIRARKIFQRMQVKKVQDVLTEWGLIPOLNWRFBIVTGOMILASQENIAFSEPIATVGQFI
<i>Ochrobactrum_sp_EGD-AQ16</i>	128	VPKQNPKNHSHVEDIKKDPKLVKVAIVSADDIDFLHGMIDESQIVMIGQGNADAPSTVQGTADADAYAATELTVAKVDN..SPELQAHFFTDPVVNGKSARSFGAFSRPEDKEFYEAFFNKAIEFKKTDYKILMTYGLSEESVEAARTVDTASLCNPK.
<i>Ochrobactrum_sp_J50</i>	128	VPKQNPKNHSHVEDIKKDPKLVKVAIVSADDIDFLHGMIDESQIVMIGQGNADAPSTVQGTADADAYAATELTVAKVDN..SPELQAHFFTDPVVNGKSARSFGAFSRPEDKEFYEAFFNKAIEFKKTDYKILMTYGLSEESVEAARTVDTASLCNPK.
<i>Verminephrobacter_sp_AH4</i>	128	VKKQNPKKLTTHADIAKDPKLVKVAIVSANNVDFLRVGVKEEQIVFIPANADAPTVO.SRADAYAATELTVALEAKG..QANVEQVQFVDPVVKDAPVRNYGFAFRPEDKELRDFAFNTALVEFRKTDYKILAKYGLSEQSIAAAAEKKVADLCAQK.
<i>Agrobacterium_turefaciens_str_C58</i>	125	VKKQNPKKLTTHADIAKDPKLVKVAIVSANNVDFLRVGVKEEQIVFIPANADAPTVO.SRADAYAATELTVALEAKG..QANVEQVQFVDPVVKDAPVRNYGFAFRPEDKELRDFAFNTALVEFRKTDYKILAKYGLSEQSIAAAAEKKVADLCAQK.
<i>Paracoccus_sp_TRP</i>	122	LPKQNPKKFQKSYADIANDPAKLGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Paracoccus_sp_J4</i>	121	LPKQNPKKFQKSYADIANDPAKLGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Mesorhizobium_loti_MAFF303099</i>	158	VKKQNPKKFQKSYEDVAKDTSATIGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Rhizobium_etli_GAT_652</i>	129	LKKQNPPLKLTYSYKDIADNPNAKIGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Rhizobium_etli_CFN_42_</i>	129	LKKQNPPLKLTYSYKDIADNPNAKIGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Ensifer_sp_ZNC0028</i>	130	LKKQNPPLKLTYSYKDIADNPNAKIGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Sinorhizobium_meliloti_1021</i>	131	LKKQNPPLKLTYSYKDIADNPNAKIGAPQGGTEKKLALDAGVPRDRLVVPDQSGQKLMVQDQIDAYSPLVLSLNDLAKKSQDANLEVFAPVEG...AP..VYCDGAAFRKKQDEALRDADFVDELAKLKESGEFAAIEPYGFSAAQAMSTTR..DQ..LCAAQ.
<i>Asinobacter_sp_J41</i>	131	LAPQNPKNISNYESLKSAAE..IMVTGAGYSNIEAAKAGVPEANIMQVPGPTEILAAVRAQADAGAGTYFTMKQLADSSNGA..VEASDPTAM...PEESFNWAGIGFRKADQDFLDKFNAAKEYIGSEAMMSAVAEYGYEASLPDQDT..TEWVCANR.
<i>Klebsiella_pneumoniae_UCI_20</i>	131	VKKQNPKKLHSHYDAFKNHDLRLAVTAGVTELKYARDSDIADQIITQVPNTTAQLQAVKAGADAAIGTALTMKDLAKKQGS..VEATDFTVD...DPKHIGYGALATRPQDKELRDQVNAELKKWLQSEELHRTVAPFGFDKSNITHKTA..AE..ICKQGS.
<i>Burkholderia_sp_WSM3556</i>	132	VKKQNPKNLHSHYDQKQPDKLAVMAAVELANSRDAVKDAQLMQVPTTAAQLQAVRARRADAAAGTALTMKDLAKKQGS..VEAVAKFTD...DPKHIGYGALATRPQDKELRDQVNAELKKWLQSEELHRTVAPFGFDKSNITHKTA..AE..ICKQGS.
<i>Pseudomonas_aeruginosa_PA7</i>	132	VKKQNPKNLHSHYDAVAKNPVRLAIMSITVELGYARAEVSEEQIVQVPTTAAQLQAVRARRADAAAGTALTMKDLAKKQGS..VEATDFTVD...DPKHIGYGALATRPQDKELRDQVNAELKKWLQSEELHRTVAPFGFDKSNITHKTA..AE..ICKQGS.

**Abbildung A6: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoine/Ectoin-Substratbindeproteins (EhuB) des EhuABCD ABC-Transporters von *S. meliloti*** Ausgewählt wurden 15 Aminosäuresequenzen von Substratbindeproteinen der EhuB-Typ ABC-Transporter in 5-Hydroxyectoin/Ectoin-katabolisierenden Bakterien. Die roten Pfeile markieren die Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (125).



<i>Desulfotomobacterium_bastinii_DSM_16055</i>	1	.....VKKLI--TSVLICMLVLTLASLAF	AAQYKGDSDQAKLSEIEGDFMTVWKN	AENMKKWSGKIDVEVYPYGTLAGSDINELAQMKVVDVFSDYAW
<i>Aurantimonas_sp._S185-9A1</i>	1	.....MAKTLAATTALTLLAGPAAFA	EWKYAIEEALVEEVQGVYATKKEHIEANS	HTVAIFPFGTLGESADTTLEAQMKAIDFVDSAPGF
<i>Fulvimonas_pelagi_HTCC2506</i>	1	1MQRQANRRVGSNAFVSHRPSFNSIDRQDPMTDLFLTRRSALAAALATTATLALSVGSASAA	EWKYAIEEALVEEVQGVYATKKEHIEANS	HTVSIFFPFGTLGESADTTLEAQMKAIDFVDSAPGF
<i>Paracoccus_tibetense_CGMCC_1.8925</i>	1	.....MR-----IKTLTAASLTALMLGAPAAAD	TWRYAFEEALDEVQGVYATKKEEVEANS	HEVQLFFPFGTLGESDNLLEQTQSSILQFVNDQSPGF
<i>Leisingeria_methylohalodivorans_MB2_DSM_14336</i>	1	.....MAK-TVKVTSAALAAAGIALT-GGATQAA	TWRYTFAEAITEVQGVYATKKEHIEANS	HEIQLFFPYGTLAGAPAGIMERTLDGIPRVEESPGF
<i>Labrenzia_sp._DG1229</i>	1	.....VLAREQQKQ--VKF-MKTKFRTLASTAMLLAGATLSHAA	DWKYAFEEESLTDVQGVYATKKEAVEANS	HTITLFFPYGTLAGESADIMEQTQAGLQFVNDQSPGF
<i>Marteletella_mediterranea_DSM_17316</i>	1	.....MRI-NKQILFSSIAATVVAVAGIGSAHAA	TWKYAFEEAMEEVQGVYATKKEHIEANS	HEVQLFFPFGTLGESADIMEQAQSSILQFVNDQSPGF
<i>Rhodobacteriales_sp._Y41</i>	1	.....MAQ-TVTFSAALAAAGIALAGS-AAQAD	TWRYAFEEAMTDVQGVYATKKEEVEANS	HEIQLFFPYGTLAGESADIMEQTQDGILQFVNDQSPGF
<i>Phaeobacter_caeuleus_13_DSM_24564</i>	1	.....MAQ-TVTFSAALAAAGIALAGS-AAQAD	TWRYAFEEAMTDVQGVYATKKEEVEANS	HEIQLFFPYGTLAGESADIMEQTQDGILQFVNDQSPGF
<i>Ruegeria_pomeroyi_DSS-3</i>	1	.....MAQ-SITFTFGAVAAAGIALAAGTAAQAD	TWRYAFEEAMTDVQGVYATKKEEVEANS	HEIQLFFPYGTLAGESADIMEQTQDGILQFVNDQSPGF
<i>Roseobacter_sp._SK209-2-6</i>	1	.....MAQ-SITFTFGAVAAAGIALAAGTAAQAD	TWRYAFEEAMTDVQGVYATKKEEVEANS	HEIQLFFPYGTLAGESADIMEQTQDGILQFVNDQSPGF
<i>Fodinicurvata_sediminis_DSM_21159</i>	1	.....MHRKALLAVTTAASVMF--AAGSLAAE	EWKFAHEESDGDVDIYAEFFKRLIEEKTGDGVTVITYYQGLGNENDITELTANSAVDQFNSASPGH	
<i>Thalassospira_lucentensis_DSM_14000</i>	1	.....MSLNKLLKATLSAAALFVAVAGTAHAAE	EWKFAHEESDGDVDIYAEFFKRLIEEKTGDGVTVITYYQGLGNENDITELTANSAVDQFNSASPGH	
<i>Vibrio_sp._Ex25</i>	1	.....MNPMMKHSYLTSAVLIAASFATSNVYAE	TWKFALEEVKGSVDQDAYAQEFKKRIENATGDGVTVITYYQGLGNENDITELTANSAVDQFNSASPGH	
<i>Pseudomonas_sp._S9</i>	1	.....MRKFSSTLKKAAAMAAAGLVLAGAGTAAE	EWKFALEEVKGSVDQDAYAQEFKKRIENATGDGVTVITYYQGLGNENDITELTANSAVDQFNSASPGH	
<i>Desulfotomobacterium_bastinii_DSM_16055</i>	98	ISFVFPQADVFLTNLYLFPSENVEPIELHWMVKNGKLMPLLEKFFRANGLVPLS	IMFEGWQWVTSKPTIEKMAFMKGLLRLHSSKLLVEGKAYBASPTMSYDVEVYSLQMLGL	ISDQVNFPLADNEMKFFVEVDHFT
<i>Aurantimonas_sp._S185-9A1</i>	87	TGSLIPELQVFLMPVLPEDPAVL-ADFYKTSSTINEDLAGLYDAQNLHLVDMF	PEGEVMTTKKEPVTSPADLEGVKFRVMTTPLLVEYNAGGATATPLPWGEVFSGLQLNM	IQQENPMFFVESTKMYEVDTHIT
<i>Fulvimonas_pelagi_HTCC2506</i>	129	TGSLIPELQVFLMPVLPEDPAVL-ADFYKTSSTINEDLAGLYDAQNLHLVDMF	PEGEVMTTKKEPVTSPADLEGVKFRVMTTPLLVEYNAGGATATPLPWGEVFSGLQLNM	IQQENPMFFVESTKMYEVDTHIT
<i>Paracoccus_tibetense_CGMCC_1.8925</i>	90	TGALPEADVFLVPYLLPEDEQQLYSFFRDSEAINGIFPELYAQDGLLELLM	PEGEVMTTSNRPIAAPADFDVVKVRVMTNPLLVS	QAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Leisingeria_methylohalodivorans_MB2_DSM_14336</i>	93	TSSPIPEADVFPVYLLPTDQDNP-VRFYKESKATNCIFKPLFTDQGLLELLNM	FKDELAMKAETPVACADRGVEVYGAMINPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Labrenzia_sp._DG1229</i>	103	TGALPEADVFPVYLLPTDQDHL-GRFFKNSKAINEDFVGLYANQGLLELLSM	PEGEVAMTTKSPVKSADLDEVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Marteletella_mediterranea_DSM_17316</i>	94	TGSLIPEADVFPVYLLPTDQDHL-ARFYKDSKAVNEMFELYAEQGLLELLMF	PEGEVAMTTKEPVESCADLEGVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Rhodobacteriales_sp._Y41</i>	93	TGSLIPEADVFPVYLLPTDQDHL-ARFYKESKAINDMFKPLYADQGLLELLNM	PEGEVAMTTKTPVTTCADLDEVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Phaeobacter_caeuleus_13_DSM_24564</i>	93	TGSLIPEADVFPVYLLPTDQDHL-ARFYKESKAINDMFKPLYADQGLLELLNM	PEGEVAMTTKTPVTTCADLDEVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Ruegeria_pomeroyi_DSS-3</i>	94	TGSLIPEADVFPVYLLPTDQDHL-ARFYKESKAINDMFKPLYADQGLLELLNM	PEGEVAMTTKTPVTTCADLDEVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Roseobacter_sp._SK209-2-6</i>	94	TGSLIPEADVFPVYLLPTDQDHL-ARFYKESKAINDMFKPLYADQGLLELLNM	PEGEVAMTTKTPVTTCADLDEVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Fodinicurvata_sediminis_DSM_21159</i>	93	LSFVPEIDVLLIPYLLSENEVDN-KEVLSNSEALYQGLSDDFESKGLKFDI	LYPEGEVMTTKKEVTPENLSGVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Thalassospira_lucentensis_DSM_14000</i>	95	LSFVPEIDVLLIPYLLSQDNEVN-KKVLSSSPTIYDGLSKDFESKGLKLYT	HYPEGEVMTTKKEVTPENLSGVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Vibrio_sp._Ex25</i>	95	LSFVPEIDVLLIPYLLSQDNEVN-KKVLSSSPTIYDGLSKDFESKGLKLYT	HYPEGEVMTTKKEVTPENLSGVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Pseudomonas_sp._S9</i>	98	LSFVPEIDVLLIPYLLSQDNEVN-KKVLSSSPTIYDGLSKDFESKGLKLYT	HYPEGEVMTTKKEVTPENLSGVKFRVMTNPLLVS	YKAFGATPTPLPWGEVYGGQGTGIDGHENPAFFIESTRTFVEQEHIT
<i>Desulfotomobacterium_bastinii_DSM_16055</i>	235	QLKNEFFIGIPTVNAQFFDSLTPEAQAMERKFWTESIVPAGKWI	TERNKDMEEIKKARPEVKFSTISPEAIKE	KAAAEVTPQFVKMGEGSQEILDAFLQDIKDAKQALGM
<i>Aurantimonas_sp._S185-9A1</i>	223	FTGHNTFTTAAANKSFYDGLSDEDKALVTEAADAAYDYIDYQKGL	LEDEALAKIQEAKPSMTVTRLTDEQREP	FKAAAEVREKFEVMTDSGKAVLDGFEADIKASQERVGG
<i>Fulvimonas_pelagi_HTCC2506</i>	205	FTGHNTFTTAAANKSFYDGLSDEDKALVTEAADAAYDYIDYQKGL	LEDEALAKIQEAKPSMTVTRLTDEQREP	FKAAAEVREKFEVMTDSGKAVLDGFEADIKASQERVGG
<i>Paracoccus_tibetense_CGMCC_1.8925</i>	226	RLGHNNFTTALMANKDFDGLSEEDQQLIRNATDAAFEHILEYQGL	TEASLEAIEAKPSITVTLTSEERAP	TRATTEQVEATFLEIGPRAQEVLDQMKADLEAAGS
<i>Leisingeria_methylohalodivorans_MB2_DSM_14336</i>	229	YVGRNNSTTTLMAKKGFHGGPSPEGGKLAQKALPAYAHTVVYLQ	AEASALAMNIGMKPEMQVTVLNDQESCF	KTAAGVGRKQIERSDRAAAIQAMTTDLAATAK
<i>Labrenzia_sp._DG1229</i>	239	YAGHNNFTTALMANKDFYDGLSAEEDQVQDAASAFDYIVGYQK	GLADSELKKIKAKPEMTITVLSDERAC	KNAAAVEAKFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Marteletella_mediterranea_DSM_17316</i>	230	YAGHNNFTTAVMANKDFDGLSEEDQALIEKASTAYDYIVDYQK	GLADSELKKITDAKPEMTITVLNEQRECF	KEAAADVEATFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Rhodobacteriales_sp._Y41</i>	229	YAGHNNFTTAVMANKDFYDGLSPEDQKLQVTAQAAYDHTVVYQ	QAAAEELAKIMEAKPEMQVTVLTDQESCF	KEAAAEVEAKFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Phaeobacter_caeuleus_13_DSM_24564</i>	229	YAGHNNFTTAVMANKDFYDGLSPEDQKLQVTAQAAYDHTVVYQ	QAAAEELAKIMEAKPEMQVTVLTDQESCF	KEAAAEVEAKFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Ruegeria_pomeroyi_DSS-3</i>	230	YAGHNNFTTAVMANKDFYDGLSAEDQQLVQNAALAAAYDHTVVYQ	QAAAEELAKIMEAKPEMQVTVLTDQESCF	KEAAAEVEAKFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Roseobacter_sp._SK209-2-6</i>	230	YAGHNNFTTAVMANKDFYDGLSAEDQVQVQNAALAAAYDHTVVYQ	QAAAEELAKIMEAKPEMQVTVLTDQESCF	KEAAAEVEAKFIEMTDSGAAIQAMTTDLAATAK
<i>Fodinicurvata_sediminis_DSM_21159</i>	229	WTGEEYTTTVVANADFWSSLSSEDRQDMLMEVRSSELTDYIEE	QKKLNDASRENKEAADDIEFIELTADEREA	KERAKELDQFYINEVGNAAEEVVKLRSEIATEEKMGAN
<i>Thalassospira_lucentensis_DSM_14000</i>	231	YAGQQQYTTTVVANADFWSSLSSEDRQDMLMEVRSSELTDYIEE	QKKLNDASRENKEAADDIEFIELTADEREA	KERAKELDQFYINEVGNAAEEVVKLRSEIATEEKMGAN
<i>Vibrio_sp._Ex25</i>	231	YAGQQQYTTTVVANADFWSSLSSEDRQDMLMEVRSSELTDYIEE	QKKLNDASRENKEAADDIEFIELTADEREA	KERAKELDQFYINEVGNAAEEVVKLRSEIATEEKMGAN
<i>Pseudomonas_sp._S9</i>	234	WSGQQQYTTTVVANADFWSSLSSEDRQDMLMEVRSSELTDYIEE	QKKLNDASRENKEAADDIEFIELTADEREA	KERAKELDQFYINEVGNAAEEVVKLRSEIATEEKMGAN

**Abbildung A7: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoine/Ectoin-Substratbindeproteins (UehA) des UehABC TRAP-Transporters von *R. pomeroyi* DSS-3** Ausgewählt wurden 15 Aminosäuresequenzen von Substratbindeproteinen der UehA-Typ TRAP-Transporter in 5-Hydroxyectoin/Ectoin-katabolisierenden Bakterien. Die roten Pfeile markieren die Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (127).



<i>Halomonas_halocynthiae_DSM_14573</i>	1	.....MHIQKLVLPMAVSASVLSLGNALAE TWKMAVGDAAGGTGYELGKFAELIEEKTGGDVTVDLFPNGQLGSE-QDTVNNASMGLDLSIVAINNITPFSPT
<i>Halomonas_sp._BJGMM-B45</i>	1	..MRPIANMTRSRTSGTSERRCGSLRSTALSGVVALTMSLSMQASADTWKMGALGDAAGGTGYELGTTFASLVEEKTGGDVTVDLFPNGQLGSE-QDTINNNASMGLDLSVLAINNITPFSPT
<i>Oceanimonas_sp._GK1</i>	1	.....MTVEGVVATKFKVEIEANSS..HKVNIYFFGTLGSE-VDMVEQAQAGILQFVDDSPGFTGSLIPE
<i>Salinivibrio_costicola_costicola_ATCC_33508</i>	1	.....MS.....IYSHLKQLTAISCVAALGF SAMANADTWRYAHEEYEGDVDDVYAHKFKYEIEDNSE..HSLQYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_elongata_DSM_2581</i>	1	.....MKAYKLLTTASIGALMLGMSTAAYSNDNWRYAHEEYEGDVDDVFAQAFKGYVEDNSD..HTVQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._23_GOM-1509m</i>	1	..MKASK.....FVST.....RSVTTKLMTTASVGALLFGLSAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..HTVQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._19A_GOM-1509m</i>	1	..MKASK.....FVST.....RSVTTKLMTTASVGALLFGLSAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..HTVQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._TD01</i>	1	..MKASK.....LIST.....RSVTTKLMTTASIGALLFGLSAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..HVSQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._HTNK1</i>	1	.....MTTASIGALLFGLSTAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAHAFKDYIEENSDD..HVSQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._KIM-1</i>	1	.....MKATKLLTTASIGALLFGMSAAHSANWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..NTVQIYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._GFAJ-1</i>	1	..MKAKK.....TFST.....RSVTTKLLTTASVGALLFGLSAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..HTVQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_sp._S18214</i>	1	..MKPNK.....FVST.....RSLTTKLITSASVGALLFGLSAAQAADNWRYAHEEYEGDVDDVFAFAYAFKEYIEDNSD..HTVQVYRFGELGSE-DDIMEQTQAGILQFVNQSPGFTGSLIPE
<i>Halomonas_lutea_DSM_23508</i>	1	..MFKKA.....LIAA.....IATA..GAMS..TSAQAETWRFALAEVDGSDVDAYAEFKKRIEEKSNGDITVEIYPTGLGTS-SQLTELVDQDAIDQLAFASPHLASVIE
<i>Halomonas_jcetgali_Hwa</i>	1	..MKLNK.....LVVG.....ITAC..GLMTAAATANAETWRFGLLEEIEGSDVGHGYAEFKKLVEEKSDGDISVELLPYGTWGSTYSALYDAVDSGSIPLGFGS-GALGGTVE
<i>Halomonas_halodenitrificans_DSM_735</i>	1	MNMKLSK.....IALG.....VAAV..GMMSAATSASAE TWRFGLLEEIEGSDVGHGYAEFKKLVEEKTGGDVTVELLPYGSWGSTYSALYDAIDGSGSIPLGFGS-GALGGTVE
<i>Halomonas_halocynthiae_DSM_14573</i>	101	VGVLTLPYVVIQGLEDAKTLTQ...GEIGEELAENTIRDAQVRLLGWAYSGCRRLTNSARPAEADLDGLVIRVPKNEIMISAYQSWGVNPNPLAWSETFTALQGGVVDGQDNFYITIDAMKF
<i>Halomonas_sp._BJGMM-B45</i>	121	VGVMTLPYVIRSPEDARTLT...GEIGQEMVDNTRDAGVRLIWAYSGCRRLTNSAHPVASPEDEGLVIRVPKNEIMIAAYQAWGVNPNPLAWSETFTALQGGVVDGQDNFYITIDAMKF
<i>Oceanimonas_sp._GK1</i>	84	AQVFLMPYVLPEKQSEINYYFKNSKVI..NEDFPKLYAEKDELLSMFPEGRVHITITQPFESPEDLGVKVRVMTSPLLVETYSKFGAVPTPLPWGEVFGALQTKMIQGENPMFYIESTKM
<i>Salinivibrio_costicola_costicola_ATCC_33508</i>	102	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAV..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_elongata_DSM_2581</i>	99	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._23_GOM-1509m</i>	109	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._19A_GOM-1509m</i>	109	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._TD01</i>	109	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._HTNK1</i>	93	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._KIM-1</i>	99	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_sp._GFAJ-1</i>	109	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_stevensii_S18214</i>	109	AQIFFIPYLLPMTDMTVEFFRQSKAI..NEMFPELYAEQGLLELLKMYPEG..EMVVTADPEVTEADLEGKKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_lutea_DSM_23508</i>	100	TGVFTLHFLFSDDNVNEQVQLGSSKA..IDMLQEAYHEQNLLELVIPEG..WMVWVADRQIQTPEDMEGKIRVMTNPLLSSTYEAFGATFTPLPWGEVYGGALQTKMIQGENPFIWIESGGL
<i>Halomonas_jcetgali_Hwa</i>	100	SQLLSLNFMVPPDQLETAQVLSNDEFLLKSDAWQKAFRRDLVPVLAELAEQ..YQVWTSNQEVDRPDMENLQIRVMDNLLREGYKAYGASPIYIAYGELYALQGGQAEQNIQVFAHEEMGF
<i>Halomonas_halodenitrificans_DSM_735</i>	102	SQLLSLNFMVPPDQMKTEVEVLSNPEFLKSDPWQEAFFRRGLVPLAELAEQ..YQVWTSNKAIEEPADMGLQIRVMDNLLREAYKAYGAAPISYIAYGELYALQGGQAEQNIQVFAHEEMGF
<i>Halomonas_halocynthiae_DSM_14573</i>	221	YEVQEYVTDSCYVFSLEPLIIGEGQFQSLSPELQMAVLEAGKEATEHSYNVLVEREEAIKESLVEEHG-MKIVEPA-NDEQEWIELATGIWPDFYDSISG-KEKLEDEVLATIGRESAPEQ...
<i>Halomonas_sp._BJGMM-B45</i>	241	HEVQNYVTDSCYVFSMEPLIISSEKFSLSPEEQEAVLAAGEEATEHSYELLAQEGEIKQLRVDEYG-MEITEPA-NDESEWIKQATSIPWPDFYDSISG-KEKLEDAALSALGRDPAP...
<i>Oceanimonas_sp._GK1</i>	185	YEVSEVITDIGHNIFTTAVMANKHFYDSLAEEDQALIQQAISEATDYILEYQGLLEESIAKVKAAPKSITLVSLDEDKRVFRREASAPVKDKFVAMTGESGKALIEQMEVDLKAIAIGK...
<i>Salinivibrio_costicola_costicola_ATCC_33508</i>	223	YEVSPNLIFTTHGWFTTASMANKEFFDGLSSDDQAMIRDAADYAFNETVQHIRGLAEKSLDKIQSASDEVTVTRLTDAQIEKFKARAPQVEETFYEMTGESGKALLNQFKKDLAVTNE...
<i>Halomonas_elongata_DSM_2581</i>	220	YEVSPNLFTTSHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQQLVQDAADAYDHTIEHIKGLSEESLEKIKAAASDEVTVTRLNDEQIQAFKERAPQVEEKFIEMTGEQGGELLDQFKADLKAVQSESEG...
<i>Halomonas_sp._23_GOM-1509m</i>	230	YEVSPHLFTTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQTLVNEASEAAYDHTIEHIKGLAEESLAKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_sp._19A_GOM-1509m</i>	230	YEVSPHLFTTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQTLVNEASEAAYDHTIEHIKGLAEESLAKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_sp._TD01</i>	230	YEVSPHLFTTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQTLVNEASEAAYDHTIEHIKGLAEESLAKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_sp._HTNK1</i>	214	YEVSPHLFTTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQTLVNEASEAAYDHTIEHIKGLADEALAKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_sp._KIM-1</i>	220	YEVSPHLVFTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQQLVRDAEAAAYAHMEHISGLADESLEKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_sp._GFAJ-1</i>	230	YEVSPNLVFTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQQLVRDAEAAAYEHIEHISGLADESLEKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_stevensii_S18214</i>	230	YEVSPNLVFTGHGWFTTAMMANQDFYEGLSSEDDQQLVRDAEAAAYEHIEHISGLADESLEKIQEASDEVTVTRLDEEQIQAFRRERAPQVEEAFLEMTGEQGGELLEQFKADLEAVTNE...
<i>Halomonas_lutea_DSM_23508</i>	222	YEVQDYMIQAKQAFITTLVAQDFYNSLPPEEQRMVDEVTDMNRSYIFEKQAFNEERLNTIKENSQ..IQVSTLTDEQRNAREKSMVDRDTFIEQAGDRGKQILETLQQDIEAAEKQKSGS
<i>Halomonas_jcetgali_Hwa</i>	222	YEVQDYMIQAKQAFVATLMNSDWYEGLSSEDDQQLVDEVTDELVTGYDQDFNSERLDTIKSKSD..INIIELNDKRAEFRELAKPVRESVDDVGERGDALEALLSAFKAED...
<i>Halomonas_halodenitrificans_DSM_735</i>	224	YEVQDYMIQAKQAFVATLMNSDWYEGLSDEHQAMLDEVTAEVLVETGHDIQSEFNSTRLDTIKENSQ..INIIELNDKRAEFREMAADPVRTFAEDVGERGKRALDILVEEFNSDDAE...

**Abbildung A8: Aminosäuresequenzvergleich des 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Substratbindeproteins (TeaA) des TeaABC TRAP-Transporters von *H. elongata*** Ausgewählt wurden 15 Aminosäuresequenzen von Substratbindeproteinen der TeaA-Typ TRAP-Transporterr in 5-Hydroxyectoin/Ectoin-katabolisierenden Bakterien. Die roten Pfeile markieren die Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (190).

<i>Burkholderia xenovorans</i> _LB400	1	-----MIEQWRLET LAVH-----GVESKYKRLVKAIAGDIENASLPAGARLPQNDVAAEIAISVOTVTNAYKELERQGLRICEVGRGSFYTA-RVETMSSYMLDTAERSV	101
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _28a24	1	-----MRNWKQAILAAR-----SGASKYKLLVTAIATDIEQHLQDQGRLLPQRLAEQDISVOTVTNAYKELERQGWVRCVEVGRGSFYVR-RISERVASSMLDRGENSL	100
<i>Thalassospira</i> _sp._NP3b2	1	-----MWLPEIDLSGET-----GPKYKTLVEAIITDIESGRRLRHEIRMPTHRELAYRKVSVQTVSAAYKEVERQGYLRSERRRGTFFVQA-RLTDRASSFILDSRQPDV	98
<i>Skermanella aerolata</i> _KACC_11604	1	-----MTEWLPVLISLQQRGGIRHSTKHKALTEAIIADIDSGRLTQGGRLPTHRLDALRLIGVSVQTVSAAYKEVERQGYLRSEVGRGTFFVKA-RVTDRASRHMHLDRSPDT	104
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> _str._C58	1	1MRQANSPSDPDV--STTRPVAWRPITLAKQK--GETKHSALTERIIADIDAGVLPKMDRMPTHRLDLARELIGSVQTVSAAYKEAERLGYLSGEIGRGTFFVK-RVTERAGRMMLDHSPT EV	116
<i>Bosea lupini</i> _DSM_26673	1	1MFRQAEKPSGARLSPIVEKAYEWHPALTKQK--GATKHAALTERIIADIDAGVLPKMDRMPTHRLDLARELIGSVQTVSAAYKEAERLGYLSGEIGRGTFFVK-RVTEQAGRMLDHSPT EV	118
<i>Yangia pacifica</i> _DSM_26894	1	-----MSHWLPIDFTIT-----RPAYRSVAQGIIVAAIGDGALRPGDRLPAAHRELAWQELIGSVQTVSRAAYEELIRADMVSGEVGRGTFFVKSGPRETVEIPWHRKRESRP	99
<i>Ruegeria pomeroyi</i> _DSS-3	1	-----MTNWLPPDSALA-----SPLHSSLALAIKAISEGKLPKGTLPTRHKLAAEELGLSVHTSVKAYESLRRQRLIDGGQVGRGSYVLD-LNTPDDQPFQLSSERGRN	98
<i>Sulfitobacter dubius</i> _DSM_16472	1	-----MPTQRLAFDLSLSVQTVSRAIDKLVEAGKIVGEVGRGTFFVRA-ASDDISMPFVSRAKAGRL	61
<i>Desulfotribrio bastinii</i> _DSM_16055	1	-----MNNWNPKSLK-----RPAYLSLVEQISDAILQGMLEPGEQLPQRLAEELIGSVQTVSRAAYEELRRRDLVLGEIGRGTFFVQA-PAPVETMPFREYRMPGNV	98
<i>Azospirillum thioophilum</i> _strain:DSM_21654	1	-----MTKWHPDASALS-----RPVYLSLADQVQRAITAGRLVVGEQLPTRHQLADELIGSVQTVSRAAYEELIRRLISGETGRGTFFIRA-AQTQVDPPIYIPQR-TDEV	97
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> _WSM2075	1	-----MTLWQDPDALIR-----RPAYQS LADQFARAIHDGRLANGARLPTRHRLADDKLSVQTVSRAAYEELIRRLISGETGRGTFFVQT-QRRPEPPYIPER-LGVE	97
<i>Aureimonas altamirensis</i> _ON-56566	1	-----MTMWYIDRPLRL-----RPYQSLADQIGRAIDGRLAAGVRLPPHVRMADGKLSVQTVSRAAYEELIRRLISGETGRGTFFVRG-DKPEGTLPYIPER-LGEI	97
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025	1	-----MTIWMNPNDTSL-----RPAYLSLAEQFARAIEGHLLPAGRLPQRLADRLGLSVQTVSRAAYEELIRRLISGETGRGTFFVGLG-PGGEARQYIPER-PGEV	97
<i>Paracoccus</i> _sp._J4	1	-----MTIWTDPDGLH-----RPAYLSLAEQFARAIIDGMLPAGSLPQRLADRLGLSVQTVSRAAYEELIRRLISGETGRGTFFVGLP-PGSENSPPYLAER-LGEL	97
<i>Burkholderia xenovorans</i> _LB400	102	VDLRLARIHTAEHDAMWRKVCATLSTIDDPWIRAFRIAGFEHHRQAGIAGLALMMP-ASADTLLVTNGAAHGIFLALASTVGPQDVTLCLEGLTDGVIIGSANVIGFTKGLLEIIEYGLHP	224
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _28a24	101	LDLSTARIVRTETDHRFWRRTECEELAAEHQEWIHAACRIAGFEHHRVGVQWGLGLK-LVDLODLLTNGTSHAIFLALASTVGPQDVTLCLEGLTDGVIIGSANVIGFTLQGVETDRHGLDP	223
<i>Thalassospira</i> _sp._NP3b2	99	LDLSIVRTAFTDHTDLSRQMHADELDPHQSWMESCPVAGFEHREIGRSWLASMGVD-AEVPNLIITNGAAQFVLAALSTIVQDDVVLTESLTDGVIIGSASIRFKLGALPTDDEGILP	221
<i>Skermanella aerolata</i> _KACC_11604	105	VDLSIVRAVFTPEHDAASRTILSMAEADONTWPMRCPRIAGLDRHREAAARLWGLPLGVE-TSVERYLITNGAAHAFLLALACVVRAGDILVTENLTDHGVIGLSNVIGFTLCGLPTDREGILP	228
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> _str._C58	117	LDLSIRGVYLDHENAASRTILREMAEDSDNSGFMRPCRPVAGLDSHRETARTWLMGMVQT-AGAERILVTNGAAHGIFLALCSIRSDNVVLCENLTDHGIIGLSNIGFTSLKGLPTDEEGILP	239
<i>Bosea lupini</i> _DSM_26673	119	VDLSIVRGVYLDAAEAASRQALAAALAEQDTSFPMRCPRIAGLDRHREAAARLWGLPLGVE-TSVERYLITNGAAHAFLLALACVVRAGDILVTENLTDHGVIGLSNVIGFTSLKGLPTDEEGILP	241
<i>Yangia pacifica</i> _DSM_26894	100	LDLSLMSPVQLPQIADAWRCSMQRIAQKLPHEMFLGPGGETLARYGAAASDWLARCGLI-ARPARVLYVAGPTPAMFVAVLMTVARHGDVIAATEAASHTKLPAAARQLGLRLOGIAHBAQMLP	222
<i>Ruegeria pomeroyi</i> _DSS-3	99	VDLSIRKPAFSQRHAEFLQVQLADLPGLDPSQRYLALSRP3CNPVNGHDAHRAAGETWRLICGLD-VPSERIIMTNGVSHGMSAALSARPGDVTVSSRITHHLVSGCYLGLRILVYIDFQDQMLP	221
<i>Sulfitobacter dubius</i> _DSM_16472	62	LDMSILKPVLDHAAHEAMQKTLRAMARSLPRAMMGFGQDLRAGDSSSAVRRWLSLCLGLD-LEGMAVITPNTGTSAMTVAMMTAAQPGDLIVSEDIHGHTLRPLARFLGIRLOGVSVAGGICP	184
<i>Desulfotribrio bastinii</i> _DSM_16055	99	VDLSIRKPAFSQRHAEFLQVQLADLPGLDPSQRYLALSRP3CNPVNGHDAHRAAGETWRLICGLD-VPSERIIMTNGVSHGMSAALSARPGDVTVSSRITHHLVSGCYLGLRILVYIDFQDQMLP	221
<i>Azospirillum thioophilum</i> _strain:DSM_21654	98	LDLSILKPVCEPLHVEAMRQALAEFLANLPAPVLSFRPNTLFARHRAVAVSWLRHCVE-AAAANVITPNTGTSAMTVAMMTAAQPGDLIVSEDIHGHTLRPLARFLGIRLOGVSVAGGICP	220
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> _WSM2075	98	LDLSILKPVCEPMHLERLQALGWLAEFLANLPAPVLSFRPNTLFARHRAVAVSWLRHCVE-AAAANVITPNTGTSAMTVAMMTAAQPGDLIVSEDIHGHTLRPLARFLGIRLOGVSVAGGICP	220
<i>Aureimonas altamirensis</i> _ON-56566	98	VDLSILKPVCEPMHLERLQALGWLAEFLANLPAPVLSFRPNTLFARHRAVAVSWLRHCVE-AAAANVITPNTGTSAMTVAMMTAAQPGDLIVSEDIHGHTLRPLARFLGIRLOGVSVAGGICP	220
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025	98	LDLSILKPVVETLHMDRLREGFWLADLAAASALSFRPNTLFARHRAVAVSWLRHCVE-AAAANVITPNTGTSAMTVAMMTAAQPGDLIVSEDIHGHTLRPLARFLGIRLOGVSVAGGICP	220
<i>Paracoccus</i> _sp._J4	98	VDLSILKPVTERMHVETFREGLHWVAENLTAPAAISFRPNSVLPQHRQVAAWLRKKE-IAAPENITITDQATSAITTVMSVAVPAGDTLAAALHTHLLMPLCKYLGHLLEALPVDDGIVP	220
<i>Burkholderia xenovorans</i> _LB400	225	EHFEEMC--DSERITLVCTITLNNPTVALMPDSRRRIARIAERYGVYVIEDDVGPLPAK--AATPISLLPDLISFYCTSLTKSVMTGLRIGYLATRRLALRAESVLRVSSMMATSPMAEV	344
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _28a24	224	EHFEDLC--GNERVTALVCTITLNNPTVALMPDSRRRIARIAERYGVYVIEDDVGPLLDGYREALPISHLPELSFYCTSLTKSVMTGLRIGYLATRRLALRAESVLRVSSMMATSPMAEV	345
<i>Thalassospira</i> _sp._NP3b2	222	DAFEREC--KQRQIRALVVTITFTNPTNCLMLGKERKQIAEIAEHYGVYVIEDDVGPLLEE--NLPPITSLFLPLKGFHVSSTLKIVMPLGLRTGFTLVPHQLSIRASSVLRVTGMMGTPLMAEI	341
<i>Skermanella aerolata</i> _KACC_11604	229	EGFEAAC--RTAKVKALVCTITFTNPTNCLMLGKERKQIAEIAEHYGVYVIEDDVGPLLEE--NLPPITSLFLPLKGFHVSSTLKIVMPLGLRTGFTLVPHQLSIRASSVLRVTGMMGTPLMAEI	348
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> _str._C58	240	DALFEAAC--AAGGVRLVCTITLNNPTNCLMLGKERKQIAEIAEHYGVYVIEDDVGPLLEE--NLPPITSLFLPLKGFHVSSTLKIVMPLGLRTGFTLVPHQLSIRASSVLRVTGMMGTPLMAEI	359
<i>Bosea lupini</i> _DSM_26673	242	EAFEAAC--RAGGVRLVCTITLNNPTNCLMLGKERKQIAEIAEHYGVYVIEDDVGPLLEE--NLPPITSLFLPLKGFHVSSTLKIVMPLGLRTGFTLVPHQLSIRASSVLRVTGMMGTPLMAEI	361
<i>Yangia pacifica</i> _DSM_26894	223	EALAEAAAAAGOMKAVYLLRSAGNYASHYQDSDRAALAAQVAAEAGLVLFCPLDGLVLT--RPPVASFARNRSYFTGLTKCLSPGLRFLGILAMPDHLAERTVNRHLSVSMATPIIAE	344
<i>Ruegeria pomeroyi</i> _DSS-3	222	DALDRHC--SENNAKVFLLLPSLANTTIVEMIEERRQALVQVARKHNLIIENDAFGPAVED--RPPVAAALAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	341
<i>Sulfitobacter dubius</i> _DSM_16472	185	EALERV--AKEPVKAVYLIRNGANLFTMITENRRAAVIEVARHNVLLIENDQSWGLQDA--RPPVMAAMAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	304
<i>Desulfotribrio bastinii</i> _DSM_16055	222	DSFSKAC--QAGGVKAVYLLPSLANTTIVEMIEERRQALVQVARKHNLIIENDAFGPAVED--RPPVAAALAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	341
<i>Azospirillum thioophilum</i> _strain:DSM_21654	221	DSLDAAC--RDGAALKVFMNPLANPLVMSLSTETRRKSLVEIARSNDVFIENDVFGPLTPN--TNPTLVSLAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	341
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> _WSM2075	221	EALDEAC--RLSDIRAVFVQPSVINPTATLMDARRREEIAAVARKHDAIIENDVGLPLVED--RPPVAAAFAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	340
<i>Aureimonas altamirensis</i> _ON-56566	221	DALDAAC--RHEGIRAVFLQPSVIGPTAALMGEGRRAAIAAVARKHDAIIENDVGLPLIED--RPPVAAAFAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	340
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025	221	AALDEAA--RRGQIRAVFLQPSVINPLAVMPPADRRAELVEVIRRHDAIIENDVGLPLIED--RPPVAAAFAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	340
<i>Paracoccus</i> _sp._J4	221	EALDHLA--RKGSRLALYMOANINPMAMTGAERAEALAAIRRHDLIIENDVGLPLIED--RPPVMAALAPERTIYLTTFKCTVSGLRAGYMAAPDEHLPALTRGVVFGWMATPLMCEI	340
<i>Burkholderia xenovorans</i> _LB400	345	ATRWIADGTAAARLVEIQERELGRQVQLQKTGKYVYLGHPQAISAWLVRVPHHWRTDRLVKLELRNRDIAVTSDPFLVRDADRPNVAVRVCVGAEEVGEETYQSLETMLDVFEQYQVHDFHFA--	465
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _28a24	346	ATRWIEHQADELVRLEQRELIQAQAVTAEIGDYLRGSHPASISAWLNVPHHWELDALQHELRRRIEALTLPDPLPPTGRPRPRAMRLCVGAECDEERLREGLCVSRVEFEQYPEIHEFRGAR	469
<i>Thalassospira</i> _sp._NP3b2	342	GARWIADGTVEQAVTVQRLALMREARQALVAELGDVVRHSPITSANVRIPEHWWQEEWFASELKRNQVAVTISDPMVTKVPRPNARICLGLGAPDPTTHRALIQRHTMDQMPGVHGFDMY	465
<i>Skermanella aerolata</i> _KACC_11604	349	AARWVEEGVAAERLVDIQREEVRTQEMIAARLQGYVLGSHPLAISAWLKVDPDYWTEDGLIRALRERGVAASTSEPEVFEAGDPNPARICIGGMSMETLNDALDTIGNTFAQYQGVNDAGFVA	472
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> _str._C58	360	ATRWVENGTARRLLDVQRTEARAKQIAVDILGDHIGSTHPLSFCAWLTVPVRWTEDGLVRLATNQNAVTPSEPIAGPGH-GGGIRICLGGRLNHASLARAALTTRVQTFEQLPPVYDGSIG	482
<i>Bosea lupini</i> _DSM_26673	362	ATRWVEDGTARLLAVQRAEATQRQIVAEITGGHVASSHPLSICAWLKVPAYWSEGLVRSLADRNVAVTSDPPIVAGPNH-GGGIRICLGGRLNHASLARAALTTRVQTFEQLPPVYDGSIG	484
<i>Yangia pacifica</i> _DSM_26894	345	AADMMESGVADTILQAHRKELAAARNMAQRLLPG-PGSAGFAHGLHRLPLEGIAERAFQRLARVAVAGANAVT--DRRPAIRVCLGLGLR-GELEAGLILASLLPAGQPTG----	459
<i>Ruegeria pomeroyi</i> _DSS-3	342	ATRWVEDGTARLLAVQRAEATQRQIVAEITGGHVASSHPLSICAWLKVPAYWSEGLVRSLADRNVAVTSDPPIVAGPNH-GGGIRICLGGRLNHASLARAALTTRVQTFEQLPPVYDGSIG	484
<i>Sulfitobacter dubius</i> _DSM_16472	305	AGRWIEEGTAQLTLNRQQLALRDADAFANVVRFGMDMTSPNGHLWLPCHDTYEEAEVLKSIRESGVAVANGASPAIGPDRHPPGLRSLIGQSF-PEFARGIRGLVRLNRGRTE----	421
<i>Desulfotribrio bastinii</i> _DSM_16055	342	AARWVENGTAKKLVGIQKSLKLLASKILOSFKFNSHPCAMHNVPLPGRWTSSEFVALACMGVAVAPSTPVVNLETVRAVRVSLGSAKE-NDFKRGRILAQILSMEPEITAE----	459
<i>Azospirillum thioophilum</i> _strain:DSM_21654	341	ATRWVESGFAMEMVDWQRKALRRHLELAAGLKGIPHRSHPEGHLHLPLLEGREAFVSHARLQGVALLPAGSAIAGPGRPDALRVSIGSTTE-AELHAGLGVIVNLLNSDEPVLHAM--	461
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> _WSM2075	341	ATRWVADGTAMEFVRWQRAALRRLLDIAAEVLAGVEYRARHGDHLHLPLLEGREAFVSHARLQGVALLPAGSAIAGPGRPDALRVSIGSTTE-GELRAGLGVVTKLLLDGDEHLLAI--	461
<i>Aureimonas altamirensis</i> _ON-56566	341	ATRWVADGTALDLVRWQRAALRRHLELAAGLKGIPHRSHPEGHLHLPLLEGREAFVSHARLQGVALLPAGSAIAGPGRPDALRVSIGSTTE-AELRGLKILIANLHRSDEPVLHAM--	460
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025	341	LSHWYDGTVAELAAWQARAMADRHALVACEIQAQMPVCPHNSLHLWLPLEGWTEEAFFVQARFMGLGVAAGHARLSERGRDRVRIALGTSAA-EELRRGLSLVAETLGGSAEPLPLLI--	461
<i>Paracoccus</i> _sp._J4	341	LSHWYDGTVERLILWQREALVHRIRIAREVLAAPFRAHPQS LHLWLPLEGWTEEAFFVQARFMGLGVAAGHARLSERGRDRVRIALGTSAA-EELRRGLSLVAETLGGSAEPLPLLI--	461

**Abbildung A9: Aminosäuresequenzvergleich von EnuR-Typ MocR/GabR-Regulatoren** Ausgewählt wurden 15 Aminosäuresequenzen von EnuR-Typ Regulatoren, die mit einem 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbauregulator assoziiert sind. Der grüne Balken markiert das putative helix-turn-helix Motif, der orange Balken die Aminotransferase-ähnliche Domäne. Die roten Pfeile deuten auf jeden Aminosäuren die konserviert sind, für die nicht-kovalente PLP-Bindung. Der rote Pfeil markiert das konservierte Lysin (Lys-302 in *R. pomeroyi* DSS-3) für die kovalente PLP-Bindung (389,390)

Agrobacterium_tumefaciens_C58-UWash	1	---	MITLDRADRALDAVQKNNRLTSEELAQIVNLSPTACQRRRLKRLREEGI	EADVAIVSPKAVGRGITMIVLVSERERADIVDRF	KAAIRTTREVMIGYYVTG	DADFI	LVITAKDM	116
Sulfitobacter_sp_EE-36	1	---	---	MIDAI DRKILHHVQRDNLLTSARLSSELVGLSQTSVQRRRLARLRATKA	EADIAVVSPEAVGRPLTMLIAVELARERSDI	IDRFKRAVRERAEVMSAYYVTG	ETDFMLIVSAKDM	114
Paracoccus_sp_361	1	M	IPPRSLRLDDRDIAILAVLSREGRITKTDLAARVNLSPTPCWDNRRLLEQAGL	RGYRAQIDLAALGPHVQVFVTVLE	DQHRSESQRFEAVIARMDAVTG	CWAI	IGGGDYLM	SVIAPDV121
Yangia_pacifica_CGMCC_1.3455	1	---	MDSTRLDTRDIAILATLSREGRITAKTELAARVNLSPTPCWERMKRLEKAGL	ITGYRAEIDLAALGPHVQVFVTVLE	DSHRAESFQIFERTVARMDEITG	CWAI	IGGGDYLM	QVVTTDV118
Falsitodobacter_sp_alg1	1	---	MKSARLDDRDIAILATLSREGRITAKTDLAARVNLSPTPCWERMKRLEQAGL	RGYRAEIDLAALGPHVQVFVTVLE	DSHRAENFQLFERTVARIPEITG	CWAI	IGGGDYLM	QVVVAPDV118
Paracoccus_homienensis_DSM_17862	1	---	MQSTRLDTRDIAILATLSREGRITAKTDLAARVNLSPTPCWERMKRLEKAGL	RGYRAEIDLAGLPHVQVFVTVLE	ESHRAESFQIFERTIDRIDEVVG	CWAI	IGGGDYLM	QVVVTQDV118
Kiloniella_sp_P1-1	1	M	HVAGLRDDRDIAILKILQTEGRITKAALAERNVLSPTPCWGRRLKRLKAGI	DSYEARLSVKFFAPLSFVFMEAE	GSHLTEDFERFEKAVQDYPEIQ	ECWAV	GGGLDYL	IKLVVKDV120
Ruegeria_pomeroyi_DSS-3	1	---	---	MQLDQRDLDIRVLSTEGRITKAALADRIQLSPTPCWDRLLKKLEQAGL	EGYGARINLKKLAPHVTVFVAAE	IADHTAASFRAFEAAMQRYEEVTAC	WALGG	GGFDYLLQIVTRDI115
Hoeflea_sp_BAL378	1	---	MAPIKLDDRDIAIKILSREGRISKSELAKRVNLSATPCWERLSRLEKAGI	ISGYQASIELRHIAPQVTVFVMAE	DNHRAATFQAF	EQAVAHYDEILSCWAL	GGGGDYLM	QIVTRDI118
Nitrateductor_pacificus_pht-3B	1	---	MLKLDHRDIKILSILQKEGRISKAALAERNVLTAPCWERLKRLEKAGI	ITGYRAEIALSKVMPSTIVFMAAE	EGHRAEDFQLFERSVQTIDAIVG	CWAV	GGGGDYIV	QIARDI116
Nitrateductor_basaltis_UMTGB225	1	---	MLKLDHRDLKILQILQTEGRISKAALAERNVLTAPCWERLKRLENAGI	ITGYRAEVALSKLGSHTIVFMAVE	EGHRAENFQLFERAVQKIDEIHG	CWAV	GGGGDYIL	QIARDI116
Thalassospira_sp_NIP3b2	1	---	MIRLDELKILKTLQREGRITKVKLAEEAVNLSPTPCWERLKRLEDLGV	ISGYHAHINLEKLVKPTLVLTETVLRHHQHDDFQIFEKAVQDIPEI	VECYAL	GGGGDYML	KVLCHDV116	
Rhizobiales_sp_HL-109	1	---	MTSIKLDITYDLRI	LATVARRGRITKRALAEAVGLSPTPCWTRLARLEKAGL	ITGYHARIPADAFGLTTVMLEVTLRSHTRADFERFESVICADPRVTAC	WLSGG	GDYLLRIV	VRDVI118
Ensifer_meliloti_1021	1	---	---	MKLDAILDLRI	LEAIQADGRITKLALAEKAGLSPTPCWMRLRLEKAGI	VTGYHARVALRRVAPVASVMMETVGNHRQADFDRFERAIAA	PIEIVAC	WSVGGGVDYILKIMTADI115
Mesorhizobium_sp_ORS3359	1	---	MAALKLDPI	DLRLDAIQRDGRITKLALAEKGLSPTPCWMRLRLEKAGI	IVSGYHAALAMRVIAPVATVLMETVLANHRQADFDRFERVVRDVPEI	VACWS	VGGGVDYVL	KVMDARI118

Agrobacterium_tumefaciens_C58-UWash	117	EDYEVFTRRRFFYENHDIKGFKT	MVVMDRVKAGFS-FPIEV	-----	155
Sulfitobacter_sp_EE-36	115	QDYEAFTDRDFFYNNPDIKGFKT	TVMDRIKASFT-LPV	-----	151
Paracoccus_sp_361	122	AAFQGVMDGLLD	SGAGVRRYFSYIVTKPVKQDP	---ALGAMLEHHRLEG	167
Yangia_pacifica_CGMCC_1.3455	119	AAFQELMDGLLES	RAGVRRYFSYIVTKPVKSDP	---PALGLLRG	159
Falsitodobacter_sp_alg1	119	ASFQVMMDDLES	RAGVRRYFSYIVTKPVKDLP	---PALGLLGN	159
Paracoccus_homienensis_DSM_17862	119	ASFQTLMDGLLES	RAGVRRYFSYIVTKPVKELP	---PALALLAD	159
Kiloniella_sp_P1-1	121	DGYQRFVDRLLAAE	IGLKRYFTYVMTKPVKQTNA-LPI	DLVLVQEQTSS	168
Ruegeria_pomeroyi_DSS-3	116	DAYQRLIDEM	LDRIQLSRFYFTYVMTKPVKGTGA-P	PLKILLGLE	159
Hoeflea_sp_BAL378	119	DSYQRLIDDL	LARRAGLARYFTYIVTKPVKQSAT-P	FDILMGLDPETD	166
Nitrateductor_pacificus_pht-3B	117	DAYQRLIDQL	LEARVGLARYFTYIVTKPVKQPGA-L	PPGLLGAAPKE	162
Nitrateductor_basaltis_UMTGB225	117	DTYQRLVDHLL	EAHLGLVRYFTYIVTKPVKRPGA-L	LQVLFEH	160
Thalassospira_sp_NIP3b2	117	DAYQRLIDGL	LVSNIGIDRYFTYIVTKVKTTSI-T	PIENLVDSPERK	163
Rhizobiales_sp_HL-109	119	GEYQDIIDG	WLARDLIGIDRYFTYVMTKVVQDEAFV	SPGMLS	161
Ensifer_meliloti_1021	116	DAYQRLVDGL	LERELGIDRYFTYIVTKTVKEETV-L	PFGLLPQAPAGQE	164
Mesorhizobium_sp_ORS3359	119	DAYQRLVDGL	LEREIGIDRYFTYIVTKTVKDET	V-LVADLLPEQG	163

**Abbildung A10: Aminosäuresequenzvergleich von AsnC-Typ Lrp/AsnC-Regulatoren** Ausgewählt wurden 15 Aminosäuresequenzen von AsnC-Typ Regulatoren, die mit einem 5-Hydroxyectoin/Ectoin-Abbaucuster assoziiert sind. Der grüne Balken markiert das putative helix-turn-helix Motiv, der orange Balken die Oligomerisierungs- und Effektorbinde Domäne. (245,246)



<i>Desulfotomaculum_bastini_DSM_16055</i>	1 LSNSSKKRSKGLIVDDDEGIRYSLKGLLEDEEFYVTEETGEKAIESLEEDQDPLVFLDIWLPG...MDGLNLEYIKKEWEWLPVVMISGHONIETAVSAIKKSAFDFIEKPLSLEK	116
<i>Paracoccus_zaxanthinifaciens_ATCC_21588</i>	1 MDSUILVDDDEIRIELISDILKDEGFEETRLAANSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	110
<i>Celestibacter_sp_P73</i>	1 MPDILVDDDEIRIELISDILKDEGFEETRLAANSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	110
<i>Ruegeria_posenoyi_DSS-3</i>	1 MDSUILVDDDEIRIELISDILKDEGFEETRLAANSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	110
<i>Nitaea_dentrificans_DSM_18348</i>	1 MAYDILVDDDEIRIELISDILKDEGFEETRLAANSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	110
<i>Thalassospira_profundimaris_WP0211</i>	1 MAHDILVDDDEIRIALISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Hoeflea_phototrophica_DFL-43</i>	1 MASDILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Agrobacterium_tumefaciens_F2</i>	1 MASDILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Rhizobium_eti_CNPAF512</i>	1 MASDILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Ensifer_fredii_GR64</i>	1 MAADILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Ensifer_meliloti_1021</i>	1 MAADILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Pseudomonas_bauzanensis_W1322</i>	1 MASDILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Ochrobactrum_anthracis_C75-325</i>	1 MAADILVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Martelia_nyctanthea_DSM_19524</i>	1 MALDVLVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Cucumibacter_marinus_DSM_18995</i>	1 MALDVLVDDDEIRIELISGILDEGFEETRYTTRQARSDEIIGALNEREPSSMLIDILWLKDSMDGIDILKQVKRNPPVPMIISGHONIETAVAAIKKSAFDFIEKPNIDQ	111
<i>Desulfotomaculum_bastini_DSM_16055</i>	177 VVITANKHLETSPTQTEHEAKTRIEETEPARTVESESISSMRETIKQVAPTDAAWVLTENETVEIVARSINAFKSNKDKFLVAVNCAATPEELIESELEGEKESFTGA-EKAQ	223
<i>Paracoccus_zaxanthinifaciens_ATCC_21588</i>	111 LMVIVIRATETSRRENSTLRQEG-R-STEMLQDSVAFKRLRQDQDKVAKSNORVMSREPTEKELAARYIHANSPRAQAFVTVPCATIEPERMEEVLFQRESPE...RGVE	221
<i>Celestibacter_sp_P73</i>	111 LMVIVIRATETSRRENSTLRQEG-R-STEMLQDSVAFKRLRQDQDKVAKSNORVMSREPTEKELAARYIHANSPRAQAFVTVPCATIEPERMEEVLFQRESPE...RGVE	221
<i>Ruegeria_posenoyi_DSS-3</i>	111 LMVIVIRATETSRRENSTLRQEG-R-STEMLQDSVAFKRLRQDQDKVAKSNORVMSREPTEKELAARYIHANSPRAQAFVTVPCATIEPERMEEVLFQRESPE...RGVE	221
<i>Nitaea_dentrificans_DSM_18348</i>	111 LLQVGRGLEAVLRRENAELRRSD-T-DRLVSEAGVAGVAAQAEKAPTSNRVLITPPASVQKEVVARMIHTNSTRANGPFTVLNCAATLSPERLEIEFGAERDDGADDTGRT	227
<i>Thalassospira_profundimaris_WP0211</i>	112 LLMVVERAIDARLRRENRELTLLRA-G-DTELVSKSGLNNLRQSAERVARVOTRILIHPPASQKEVVARMIHQKSAARAEAFVVLNCCANISPDTEESLFGAVATSD...REAR	223
<i>Hoeflea_phototrophica_DFL-43</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Agrobacterium_tumefaciens_F2</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Rhizobium_eti_CNPAF512</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Ensifer_fredii_GR64</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Ensifer_meliloti_1021</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Pseudomonas_bauzanensis_W1322</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Ochrobactrum_anthracis_C75-325</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Martelia_nyctanthea_DSM_19524</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Cucumibacter_marinus_DSM_18995</i>	112 LLLVAERALETSKUKREVELEKRRS-G-D-PAELIETVAVASQLKQITDKIAPTNSRVMIIQPPSSQKELVARMIRKSTNSTGPFVALNAAAIIPDMEIALFOTEGTT...-G-OPRR	223
<i>Desulfotomaculum_bastini_DSM_16055</i>	234 IKFELADRRTFLDLEIDMSLKTQAKILRLIQEDRERVOGRKTNNVDVVRVIAATNNKLQELIEGSEGFREDLYRLKVFLEVPPLREKRAADITPLINELIERLVRRHGFQKLEFSP	351
<i>Paracoccus_zaxanthinifaciens_ATCC_21588</i>	222 PLLLEQAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	339
<i>Celestibacter_sp_P73</i>	222 PLLLEQAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	339
<i>Ruegeria_posenoyi_DSS-3</i>	222 PLLLEQAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	339
<i>Nitaea_dentrificans_DSM_18348</i>	228 VQMLQDQAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	345
<i>Thalassospira_profundimaris_WP0211</i>	224 TVELLELAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Hoeflea_phototrophica_DFL-43</i>	224 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Agrobacterium_tumefaciens_F2</i>	224 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Rhizobium_eti_CNPAF512</i>	224 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Ensifer_fredii_GR64</i>	224 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Ensifer_meliloti_1021</i>	224 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	341
<i>Pseudomonas_bauzanensis_W1322</i>	223 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	340
<i>Ochrobactrum_anthracis_C75-325</i>	223 VQALEERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	340
<i>Martelia_nyctanthea_DSM_19524</i>	227 SQAERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	344
<i>Cucumibacter_marinus_DSM_18995</i>	227 SQAERAHGSIIFYDEVGDMLGTQPKILRLVLEDDQIRAGQDTRVVRDLRVLSSTNRDQTEIAAGFRQELDYRLNVVIAVPSLADRRREDIGLARHRIEIHFGHQSLTPRDLE	344
<i>Desulfotomaculum_bastini_DSM_16055</i>	352 ETIKIMQYWPQNVREIKNFVERMLIMYGQKV...VQDPKLPPEILQTPAVAEKDDSSSTLFLPEGEIDFKARTEFEARFLEAKLKEFDQSVKLEAVQLERSLYRLKLT	404
<i>Paracoccus_zaxanthinifaciens_ATCC_21588</i>	340 ETVAALQSMRWPNQIRQLRNVIERVLIAEGPAA...IQPAELPQAGTPENQ-DALSQGPQIT...SMALREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	447
<i>Celestibacter_sp_P73</i>	340 DAAALQMTSMRWPNQIRQLRNVIERVLIAEGPAA...IQPAELPQAGTPENQ-DALSQGPQIT...SMALREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	447
<i>Ruegeria_posenoyi_DSS-3</i>	340 EAAVLQMTSMRWPNQIRQLRNVIERVLIAEGPAA...IQPAELPQAGTPENQ-DALSQGPQIT...SMALREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	447
<i>Nitaea_dentrificans_DSM_18348</i>	346 DRIALQSYDWPQNVQIRQLRNVIERVLIAEGPAA...EPVQMLPPEIESSAPISLNFQDQVEIM...QMLPAREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	456
<i>Thalassospira_profundimaris_WP0211</i>	342 EAMATLHRYPQNVQIRQLRNVIERVLIAEGPAA...IQPAELPQAGTPENQ-DALSQGPQIT...SMALREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	454
<i>Hoeflea_phototrophica_DFL-43</i>	342 DALAVLAQHWPNQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	452
<i>Agrobacterium_tumefaciens_F2</i>	342 DAMAVLQADWPQNVQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	452
<i>Rhizobium_eti_CNPAF512</i>	342 DAMAVLQADWPQNVQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	452
<i>Ensifer_fredii_GR64</i>	342 DALAVLAQHWPNQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	452
<i>Ensifer_meliloti_1021</i>	342 DALAVLAQHWPNQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	452
<i>Pseudomonas_bauzanensis_W1322</i>	341 DALAVLAQHWPNQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	451
<i>Ochrobactrum_anthracis_C75-325</i>	341 DAMAVLQADWPQNVQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	451
<i>Martelia_nyctanthea_DSM_19524</i>	346 DAMAVLQADWPQNVQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	457
<i>Cucumibacter_marinus_DSM_18995</i>	346 DALAVLAQADWPQNVQIRQLRNNIERLMLARSQDQD-TPIISADMLPNEVDQDLPKIS-AAGQDHIM...TLPLREARELFEREYLVADINRFQGNISRTAEFVGMERSALHRLKLSL	457
<i>Desulfotomaculum_bastini_DSM_16055</i>	405 I I Q I D I . . . . .	405
<i>Paracoccus_zaxanthinifaciens_ATCC_21588</i>	405 VVGGARSDDDEMVGK... . . . .	405
<i>Celestibacter_sp_P73</i>	447 GVVTTGKQGVAVYSEDAAG... . . . .	447
<i>Ruegeria_posenoyi_DSS-3</i>	447 GVVTSKSGARVAHMEIEITVE... . . . .	447
<i>Nitaea_dentrificans_DSM_18348</i>	457 GVSASERSA... . . . .	457
<i>Thalassospira_profundimaris_WP0211</i>	405 GVNQD... . . . .	405
<i>Hoeflea_phototrophica_DFL-43</i>	403 V... . . . .	403
<i>Agrobacterium_tumefaciens_F2</i>	403 V... . . . .	403
<i>Rhizobium_eti_CNPAF512</i>	403 V... . . . .	403
<i>Ensifer_fredii_GR64</i>	403 V... . . . .	403
<i>Ensifer_meliloti_1021</i>	403 V... . . . .	403
<i>Pseudomonas_bauzanensis_W1322</i>	402 V... . . . .	402
<i>Ochrobactrum_anthracis_C75-325</i>	402 V... . . . .	402
<i>Martelia_nyctanthea_DSM_19524</i>	408 L... . . . .	408
<i>Cucumibacter_marinus_DSM_18995</i>	408 L... . . . .	408

Abbildung A11:

## Aminosäuresequenzvergleich von NtrX-Typ

## Antwortregulatoren Ausgewählt wurden 15

## Aminosäuresequenzen von NtrX-Typ

## Antwortregulatoren, die als Teil eines NtrXY-

## Zweikomponentensystems in den Genomen

## von 5-Hydroxytryptoin/Ectooin-Abbauern kodiert

## werden. Der pinkfarbene Balken markiert die

## katalytische REC-Domäne. Der orangefarbene

## Balken markiert die putative ATP-Bindedomäne

## innerhalb dessen die ATP-Bindestelle (grüne

## Pfeile) liegt. Der konservierte Argininfinger ist

## mit einem roten Pfeil markiert. Das putative

## helix-turn-helix Motiv wird durch einen grünen

## Balken eingefasst. Der für die Orientierung des

## ATPs wichtige Argininfinger ist durch einen

## roten Pfeil gekennzeichnet (389,391).



761

768  
772

785

15 Aminosäuresequenzen von NtrY-Typ Sensorkinasen, die als Teil eines NtrXY-

Die grünen Balken markieren die putativen membranspannenden Domänen. Jede dieser Domänen

im Periplasma. Der pinkfarbene Balken umspannt die PAS-Signalerkennungsdomäne. Mit dem gelben

Darunter wurde die Dimethylsterangedonans (Mikro-Supernanits) markiert, welche zusätzlich die Blauschwarze (Mikro-Supernanits) enthält. Deren einfachste Ballon enthält eine MATH-Box.

domane innerhalb dessen die AIT-Bindestelle (grüne Fläche) liegt (207,509).

Stamm	Genotyp	LacZ-Fusion	LacZ-Aktivität [MU] (Induktionsfaktor)				
			Glucose	Ectoin	5-Hydroxyectoin	Glucose + Ectoin	Glucose + 5-Hydroxyectoin
J470	wildtyp	<i>P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	22 ± 3	14 ± 7	34 ± 11		
J470	wildtyp	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	24 ± 8	<b>870 ± 33</b>	<b>2269 ± 128</b>	<b>444 ± 60</b>	<b>1753 ± 149</b>
J470	wildtyp	<i>P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	21 ± 5	<b>622 ± 4,5</b>	<b>1347 ± 23</b>	<b>414 ± 21</b>	<b>502 ± 97</b>
ASR6	$\Delta(enuR\text{-}eutABCDE\text{-}asnC\text{-}ssd\text{-}atf::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	26 ± 4			19 ± 2 <b>(0,045)</b>	20 ± 1 <b>(0,011)</b>
ASR7	$\Delta(enuR_{1-975::Gm})1$	<i>P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	29 ± 3	25 ± 5	47 ± 15		
ASR7	$\Delta(enuR_{1-975::Gm})1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	25 ± 8	698 ± 85	4368 ± 205 <b>(2)</b>		
ASR7	$\Delta(enuR_{1-975::Gm})1$	<i>P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	420 ± 130	388 ± 58 <b>(0,62)</b>	690 ± 373 <b>(0,51)</b>		
ASR7	$\Delta(enuR_{1-975::Gm})1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>*-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	39 ± 8	26 ± 6 <b>(0,029)</b>	29 ± 3 <b>(0,013)</b>		
ASR8	$\Delta(eutD::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	16 ± 7			172 ± 79 <b>(0,38)</b>	1736 ± 142
ASR9	$\Delta(ntrXY::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	15 ± 0,5			195 ± 143 <b>(0,43)</b>	278 ± 184 <b>(0,16)</b>
ASR10	$\Delta(asnC\text{-}ssd\text{-}atf::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	17 ± 0,5			222 ± 19 <b>(0,5)</b>	281 ± 198 <b>(0,16)</b>
ASR11	$\Delta(eutABC::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	39 ± 18			376 ± 107 <b>(0,85)</b>	198 ± 15 <b>(0,11)</b>
ASR12	$\Delta(eutABCDE\text{-}asnC\text{-}ssd\text{-}atf::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	35 ± 14			325 ± 15 <b>(0,73)</b>	338 ± 147 <b>(0,2)</b>
ASR13	$\Delta(enuR_{1-1395::Gm})1$	<i>P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	28 ± 11	29 ± 3 <b>(0,046)</b>	51 ± 10 <b>(0,037)</b>		
ASR14	$\Delta(ssd\text{-}atf::Gm)1$	<i>P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ</i>	18 ± 5	578 ± 73 <b>(0,66)</b>	1704 ± 277 <b>(0,75)</b>		

**Tabelle A1: Die Induzierbarkeit des *uehA*-Promotors in verschiedenen *R. pomeroyi*-Mutantenhintergründen** Quantitative Auflistung der gemessenen LacZ-Assay-Ergebnisse. Aufgezeigt sind die verwendeten *R. pomeroyi*-Stämme und ihre entsprechenden Genotypen, sowie die darin enthaltene *lacZ*-Fusion. Die angegebenen Miller Units (MU) errechneten sich aus vier biologischen Parallelen und je drei technischen Parallelen. Der angegebene Induktionsfaktor (in Klammern angegeben; fett gedruckt) errechnete sich aus dem Quotienten zwischen Mutanten-Promotoraktivität und Wildtyp-Promotoraktivität [in rot (*P<sub>enuR-enuR</sub>-P<sub>uehA</sub>-lacZ*-Fusion) bzw. blau (*P<sub>uehA</sub>-lacZ*-Fusion) dargestellt].

## 9. Erklärung

---

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Genetik und Biochemie des Katabolismus von 5-Hydroxyectoin und Ectoin in  
dem marinen Bakterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3**

selbständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel  
verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen  
Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner  
anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken  
gedient.

---

Annina Schulz

---

Ort, Datum